

INAUGURAL-DISSERTATION

Thema

**Tbx20 – Ein essentieller Regulator der
Entwicklung des atrioventrikulären Kanals
im Zebrafisch**

von

Diplom-Biochemiker Alexander Grundt

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Alexander Grundt
aus Rüdersdorf bei Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2006

Thema

**Tbx20 – Ein essentieller Regulator der
Entwicklung des atrioventrikulären Kanals
im Zebrafisch**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland
Prof. Dr. Werner Buselmaier

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2.1	Zusammenfassung	4
2.2	Abstract.....	5
3	Einleitung	6
3.1	Embryonale Herzentwicklung im Zebrafisch	7
3.2	Molekulare Marker der Herzentwicklung im Zebrafisch	10
3.3	Entwicklung des atrioventrikulären Kanals.....	12
3.4	Funktionelle Genomanalyse.....	13
3.5	Die Isolierung von <i>weiches herz</i> ^{m245}	14
3.6	Genetische Kartierung von Genen.....	14
3.7	Genetische Karten im Zebrafisch	16
3.8	Physikalische Kartierung im Zebrafisch	16
3.9	Tbx20 - Ein Mitglied der Tbox-Genfamilie	17
3.10	Die Rolle von Tbx20 in der Herzentwicklung.....	19
4	Material und Methoden	22
4.1	Material	22
4.1.1	Geräte	22
4.1.2	Software.....	24
4.1.3	Datenbanken.....	24
4.1.4	Gebrauchsmaterialien	24
4.1.5	Verbrauchsmaterialien	25
4.1.6	Chemikalien	26
4.1.7	Lösungen und Reagenzien	27
4.1.8	Immunologische Materialien	28
4.1.8.1	Mediensupplemente.....	28
4.1.8.2	Inhibitoren	28
4.1.8.3	Antikörper und Farbstoffe.....	28
4.1.8.4	Peptide und (Oligo-)Nukleotide	29
4.1.9	Molekularbiologische Materialien	29
4.1.9.1	Plasmide	30
4.1.9.2	Kits.....	30
4.1.9.3	<i>Morpholino antisense</i> -Oligonukleotide.....	30
4.1.10	Puffer und Lösungen.....	31
4.1.11	Fischlinien	32
4.2	Methoden.....	33
4.2.1	Makroskopische und mikroskopische Methoden.....	33
4.2.1.1	Fischzucht.....	33
4.2.1.2	Foto- und Videodokumentation	34
4.2.1.3	Präparation von embryonalen und adulten Zebrafischherzen.....	34
4.2.1.4	Injektion von Oligonukleotiden in Zebrafischembryonen	34
4.2.1.5	Mikroangiographie	35
4.2.1.6	Behandlung von Zebrafischembryonen mit verschiedenen Inhibitoren....	36

4.2.1.7	Behandlung von neonatalen Kardiomyozyten mit SU5402	36
4.2.1.8	Bestimmung der Kardiomyozytenzahl	36
4.2.2	Histologische Methoden	36
4.2.2.1	Einbettung von Embryonen in JB4	36
4.2.2.2	Einbettung von Zebrafischembryonen und adulten Zebrafischherzen	37
4.2.2.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	37
4.2.2.4	Siriusrot-Färbung	37
4.2.3	Immunologische Methoden	38
4.2.3.1	<i>In Situ</i> -Hybridisierung	38
4.2.3.2	Doppelimmunfluoreszenzfärbung	39
4.2.3.3	Detektion apoptotischer Zellen	39
4.2.3.4	Antibiotika und Selektionsplatten	40
4.2.4	Molekularbiologische Methoden	40
4.2.4.1	Nukleotidaufreinigungsmethoden	40
4.2.4.1.1	DNA-Isolation aus Zebrafischembryonen	40
4.2.4.1.2	RNA-Isolation	40
4.2.4.1.3	Plasmid-Isolation aus <i>E.coli</i>	41
4.2.4.1.4	Plasmid-Isolation aus <i>E.coli</i> zur Injektion	41
4.2.4.1.5	BAC-DNA-Isolation	41
4.2.4.1.6	BAC-DNA-Isolation zur Injektion	41
4.2.4.1.7	Gelextraktion	42
4.2.4.1.8	DNA-Aufreinigung	42
4.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	42
4.2.4.3	YAC-End-Isolation	42
4.2.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion	43
4.2.4.5	<i>Real Time</i> -PCR	43
4.2.4.6	PCR-Mutagenese	44
4.2.4.6	Agarose-Gelelektrophorese	44
4.2.4.7	Denaturierende Gelelektrophorese	45
4.2.4.8	Reverse Transkription	46
4.2.4.9	Herstellung von <i>antisense</i> -RNA-Sonden	46
4.2.4.10	mRNA-Herstellung durch <i>in vitro</i> -Transkription	47
4.2.4.11	Restriktionsverdau von DNA	47
4.2.4.12	Alkalische Dephosphorylierung von Plasmiden	47
4.2.4.13	Ligation von DNA	47
4.2.4.14	Transformation von <i>E.coli</i>	48
4.2.4.15	Microarray	48
5	Ergebnisse	49
5.1	<i>Weiches herz</i> ^{m245} - Embryonaler Tod durch kontraktile Dysfunktion	49
5.2	Charakterisierung von <i>weiches herz</i> ^{m245}	49
5.2.1	Ventrikuläre Dysfunktion in <i>weiches herz</i> ^{m245}	49
5.2.2	Unauffällige ventrikuläre Myofilamentstruktur in <i>weiches herz</i> ^{m245}	51
5.3	Untersuchung der Herzmorphologie von <i>weiches herz</i> ^{m245}	53
5.3.1	Defekte Herzmorphologie in <i>weiches herz</i> ^{m245}	53
5.3.2	Verringerte ventrikuläre Kardiomyozytenproliferation in <i>weiches herz</i> ^{m245}	54
5.3.3	Keine endokardiale AVC-Anlage in <i>weiches herz</i> ^{m245}	55
5.3.4	AV-Klappendefekte in adulten heterozygoten <i>whz</i> -Fischen	56
5.3.5	Koexpression kammerspezifischer Gene in der AV-Region von <i>whz</i>	58
5.3.6	Misspezifikation der AV-Region in <i>weiches herz</i> ^{m245}	61

5.3.6.1	Gestörte AV-Überleitung in <i>weiches herzm245</i>	61
5.3.6.2	Kein spezialisiertes AV-Überleitungssystem in <i>weiches herzm245</i>	62
5.3.6.3	Transmyokardiale Expression von <i>tbx2</i> in <i>weiches herzm245</i>	62
5.3.6.4	Transmyokardiale Expression von <i>versican</i> in <i>weiches herzm245</i>	63
5.3.6.5	Transmyokardiale Expression von <i>gata5</i> in <i>weiches herzm245</i>	64
5.3.6.6	Transendokardiale Expression von <i>notch1b</i> in <i>weiches herzm245</i>	64
5.3.6.7	Fehlende Induktion der AVC-Entwicklung in <i>weiches herzm245</i>	65
5.3.6.8	Normale Vaskulo- und Angiogenese in <i>weiches herzm245</i>	67
5.4	Positionelle Klonierung von <i>weiches herzm245</i>	68
5.4.1	Genetische Kartierung von <i>weiches herzm245</i>	68
5.4.2	Kandidatengenversuche mit <i>tbx20</i> und <i>zgc:56020</i>	69
5.4.3	Kardiale Expression von <i>tbx20</i> und <i>zgc:56020</i>	69
5.4.4	<i>Morpholino antisense-Knockdown</i> von <i>tbx20</i> phänokopiert <i>whz</i>	71
5.4.5	Insertionsmutation in <i>whz-tbx20</i> -mRNA.....	72
5.4.6	Reduzierte Splice-Aktivität von Intron 6 in <i>weiches herzm245</i>	75
5.5	Genetischer <i>rescue</i> von <i>whz</i> durch Expression von WT- <i>tbx20</i>	76
5.6	Verlust der transkriptorischen Aktivatorfunktion in <i>whz</i> -Tbx20.....	78
5.7	Inhibition der endothelialen AV-Ring-Bildung durch <i>tbx20-Knockdown</i>	80
5.8	Angiogenesedefekte durch <i>tbx20-Knockdown</i> im Zebrafisch.....	81
5.9	Tbx20b reguliert die Angiogenese im Zebrafisch.....	82
5.10	Ungestörte Regulation von <i>tbx5</i> in <i>weiches herzm245</i>	83
5.11	Normale synergistische Aktivität zwischen Tbx20 und Tbx5 in <i>whz</i>	84
5.12	Identifikation neuer Signalwege in der AVC-Entwicklung.....	85
5.13	Phänokopie von <i>weiches herzm245</i> durch <i>fgf8-Knockdown</i>	86
5.14	Funktionelle AVC-Defekte durch Inhibierung des FGF-Signalwegs.....	86
5.15	Keine negativ inotropen Effekte durch SU5402	87
6	Diskussion.....	88
6.1	<i>Weiches herzm245</i> kodiert für <i>tbx20</i>	88
6.2	Normale kardiale Fusion in <i>weiches herzm245</i>	90
6.3	Regulation der Herzentwicklung durch Tbx20 und Nkx2.5	91
6.4	Tbx20 initiiert die Entwicklung des atrioventrikulären Kanals.....	92
6.5	Aktivator- und Repressorfunktion von Tbx20 essentiell für AVC- Entwicklung..	96
6.6	Regulation der Angiogenese im Zebrafisch durch Tbx20b	97
6.7	Identifikation neuer Signalwege in der Entwicklung des AVC	98
6.8	Ausblick.....	100
7	Abkürzungen.....	102
8	Literaturverzeichnis.....	105
9	Danksagung.....	118

2.1 Zusammenfassung

Etwa 1 % aller Lebendgeburten leiden unter angeborenen Herzfehlern, von denen viele untherapiert zum Tod durch Herzinsuffizienz führen. Um die Früherkennung von angeborenen Herzfehlern zu erleichtern und Therapieansätze zu finden, wurden Tiermodelle entwickelt, die es ermöglichen, angeborene Herzfehler detailliert zu erforschen.

Weiches *herz*^{m245} (*whz*) ist eine rezessive, embryonal letale Zebrafischmutante, die im Rahmen der funktionellen Genomanalyse durch ENU-Mutagenese erzeugt wurde. Homozygot-mutante *whz*-Embryonen entwickeln im Verlauf ihrer Herzentwicklung eine kontraktile Dysfunktion, die zum vollständigen Verlust der Blutzirkulation und damit zum embryonalen Tod führt.

Durch histologische und molekularbiologische Untersuchungen von mutanten *whz*-Embryonen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Entwicklung des atrioventrikulären Kanals (AVC) bereits im frühesten durch molekulare Marker nachweisbaren Entwicklungsstadium inhibiert ist. So entwickeln mutante *whz*-Embryonen weder AV-Klappen, noch ein spezialisiertes AV-Überleitungssystem, das im Wildtyp (WT) die sequentielle Kontraktion von Atrium und Ventrikel steuert.

Die positionelle Klonierung ergab, dass der *whz*-Phänotyp durch einen Gendefekt in *tbx20*, einem Tbox-Transkriptionsfaktor, hervorgerufen wird, der zum partiellen Verlust der transkriptionalen Aktivatorfunktion führt. Die *loss of function*-Mutation in *tbx20* wurde durch einen genetischen *rescue* von *whz* durch WT-*tbx20* bestätigt. Die durchgeführten Analysen kamen zu dem Schluss, dass im Zebrafisch die Entwicklung des AVC durch die synergistische transkriptionale Aktivität von Tbx20 mit Nkx2.5, Gata5 und Tbx5 reguliert wird und dass *bmp4* ein direktes Zielgen von Tbx20 darstellt.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit im Zebrafisch eine zweite Isoform von Tbx20, Tbx20b, isoliert, die nicht die Entwicklung des AVCs oder des Herzens, sondern die Angiogenese reguliert.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der FGF-Signalweg sowohl die morphologische als auch die funktionelle Entwicklung des AVCs reguliert und dort möglicherweise durch Tbx20 induziert wird.

2.2 Abstract

Nearly 1% of live births suffer from congenital heart diseases, frequently leading to lethal heart failure in untreated patients. To allow early diagnosis of congenital heart diseases and the development of new therapeutical approaches, animal models have been developed allowing accurate investigations of cardiac disorders.

Weiches herz^{m245} (*whz*) represents a recessive, embryonic lethal zebrafish heart mutant, generated by ENU-mutagenesis in the setting of functional genome analysis. Hearts of homozygous mutant *whz* embryos develop early contractile dysfunction resulting in the total abolition of blood circulation and consequently leading to embryonic death.

In this thesis, the complete loss of atrio-ventricular canal (AVC) development in mutant *whz* embryos was demonstrated by both histomorphological and molecular analyses. It was shown that *whz* embryos fail to develop atrio-ventricular valves and an appropriate atrio-ventricular conduction system, responsible for sequential contractions of atrium and ventricle under physiological conditions.

It was demonstrated by positional cloning that a “loss of function” mutation in *tbx20*, a member of the Tbx20 transcription factor family, causes the characteristic *whz* phenotype due to the loss of the transcriptional activator function. Accordingly, homozygous mutant *whz* embryos could be genetically rescued by transient ectopic wildtype-*tbx20* expression. Several analyses revealed that synergistic functions of Tbx20 with Nkx2.5, Gata5 and Tbx5, respectively, regulate the development of the AVC in zebrafish and that Tbx20 is a direct upstream regulator of *bmp4*.

A second Tbx20 isoform, Tbx20b, lacking transcriptional domains was isolated and functionally analysed. In contrast to full Tbx20, this isoform plays an important role in the regulation of angiogenesis rather than in the development of the AVC.

Furthermore, it was shown that the FGF pathway is linked to atrio-ventricular development, probably induced by Tbx20.

In conclusion, Tbx20 activation is an early event in atrio-ventricular valve development as well as in the formation of a physiological atrio-ventricular conduction system since its loss of function leads to the total failure of these heart structures resulting in early cardiac death.

3 Einleitung

Etwa 1 % aller Lebendgeburten leiden unter angeborenen Herzfehlern, von denen viele durch komplizierte chirurgische Eingriffe behoben werden müssen. Das Risiko einer Herzinsuffizienz, dem Endstadium vieler undiagnostizierter und untherapierter angeborener Herzfehler, steigt ab dem fünfzigsten Lebensjahr auf bis zu 17 % der Gesamtbevölkerung an. Damit sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den westlichen Industrieländern die häufigste Todesursache [120]. Die molekularen Defekte, die zu angeborenen Herzfehlern führen können, sind bis heute weitestgehend unbekannt, wodurch Früherkennung, als auch Therapie dieser Erkrankungen erschwert wird. Kopplungsanalysen in betroffenen Familien, welche die genetische Ursache einzelner angeborener Herzfehler aufklären könnten, sind oft durch den embryonal letalen oder schnell progredienten Krankheitsverlauf und unzureichende Diagnostik erschwert. Dennoch konnte in einigen geeigneten Großfamilien die Kopplung angeborener Herzfehler zu chromosomalen Loci beschrieben und ein Teil der zugrunde liegenden Gendefekte bestimmt werden.

Die systematische Identifizierung und Charakterisierung der zu angeborenen Herzfehlern führenden Gendefekte und Signalwege stellt die Grundlage für das Verständnis der molekularen und physiologischen Herzentwicklung des Menschen dar. Erst darauf basierend können zukunftsweisende Therapieformen durch medikamentöse Therapie bzw. durch Gen-Addition und *antisense*-vermittelte Gen-Ausschaltung entwickelt werden, um angeborenen Defekten des kardiovaskulären Systems und deren Folgen entgegenzuwirken.

Zur funktionellen Genomanalyse, d.h. der Zuordnung neuer Funktionen zu bekannten Genen, wurden verschiedene Nicht-Vertebraten-Tiermodelle, wie u.a. *Drosophila melanogaster*, etabliert, die sich durch eine gute genetische Manipulierbarkeit auszeichnen und zu einer beeindruckenden Zahl neuer Genfunktionen geführt haben. Da die in *Drosophila* identifizierten Genfunktionen, die das kardiovaskuläre System betreffen, aufgrund zu geringer Homologie nur unzureichend auf den Menschen übertragbar sind, wurde auf Vertebraten-Modelle, wie *Mus musculus*, ausgewichen. Diese zeigen zwar eine fast vollständige Homologie zum Menschen, können aber nur schwer genetisch manipuliert werden und sind daher nicht zur funktionellen Genomanalyse geeignet.

Aufgrund dessen hat sich der Zebrafisch, *Danio rerio*, ein 3-4 cm großer tropischer Süßwasserfisch aus der Gruppe der Karpflinge (*Cyprinidae*), zu einem etablierten Vertebratenmodell zur Identifizierung genetischer Faktoren von kardiovaskulären Erkrankungen entwickelt. Er ermöglicht in einzigartiger Weise eine Verknüpfung von funktioneller Genomanalyse und Entwicklungsbiologie. Die Vorteile des Zebrafischs liegen darin, dass die Generationszeiten kurz, die Zahl der Nachkommen hoch, die Tierhaltungskosten sehr niedrig und die sich extrakorporal entwickelnden Tiere in der Larvenform transparent sind, so dass Herzentwicklung und -funktion *in vivo* direkt beobachtet werden können (Abb. 1) [22, 42, 109]. Bereits zwei Tage nach der Befruchtung (*days post fertilization*, dpf) ist das kardiovaskuläre System des Zebrafischs nahezu vollständig ausgebildet. Im Gegensatz zu anderen Vertebratenmodellen, wie der Maus, benötigen Zebrafischembryonen während der ersten 9 Tage ihrer Entwicklung kein intaktes Herz-Kreislaufsystem, da Sauerstoff über Diffusion in den Embryo gelangt [31]. Entsprechend kann sich der Zebrafischembryo selbst bei Vorliegen eines schweren kardiovaskulären Defektes und fehlender Blutzirkulation weiterentwickeln und damit eine detaillierte Charakterisierung eines pathologischen Phänotyps zulassen, ohne dass unkalkulierbare Nebeneffekte des moribunden Embryos berücksichtigt werden müssen [2, 40, 55, 93]. Ein weiterer Vorteil von Zebrafischen im Vergleich zu anderen Vertebratenmodellen liegt in seiner leichten genetischen Manipulierbarkeit. Neben transienten molekularbiologischen Manipulationstechniken, wie RNA-Überexpression oder siRNA/*Morpholino antisense gene knockdown*, können leicht transgene oder mutagenisierte Zebrafischlinien erzeugt werden.

3.1 Embryonale Herzentwicklung im Zebrafisch

Das kardiovaskuläre System des Zebrafischs entwickelt sich sehr schnell. Schon 72 Stunden nach Befruchtung der Eizellen (*hours post fertilization*, hpf) ist das Herz-Kreislauf-System voll ausgereift und entspricht in der Struktur und Funktion dem eines neugeborenen Säugers. Damit ist das Herz des Zebrafischs wie das Herz oder herzförmige Organe aller Metazoen mit Kreislaufsystem in der embryonalen Entwicklung das erste vollständig ausdifferenzierte Organ.

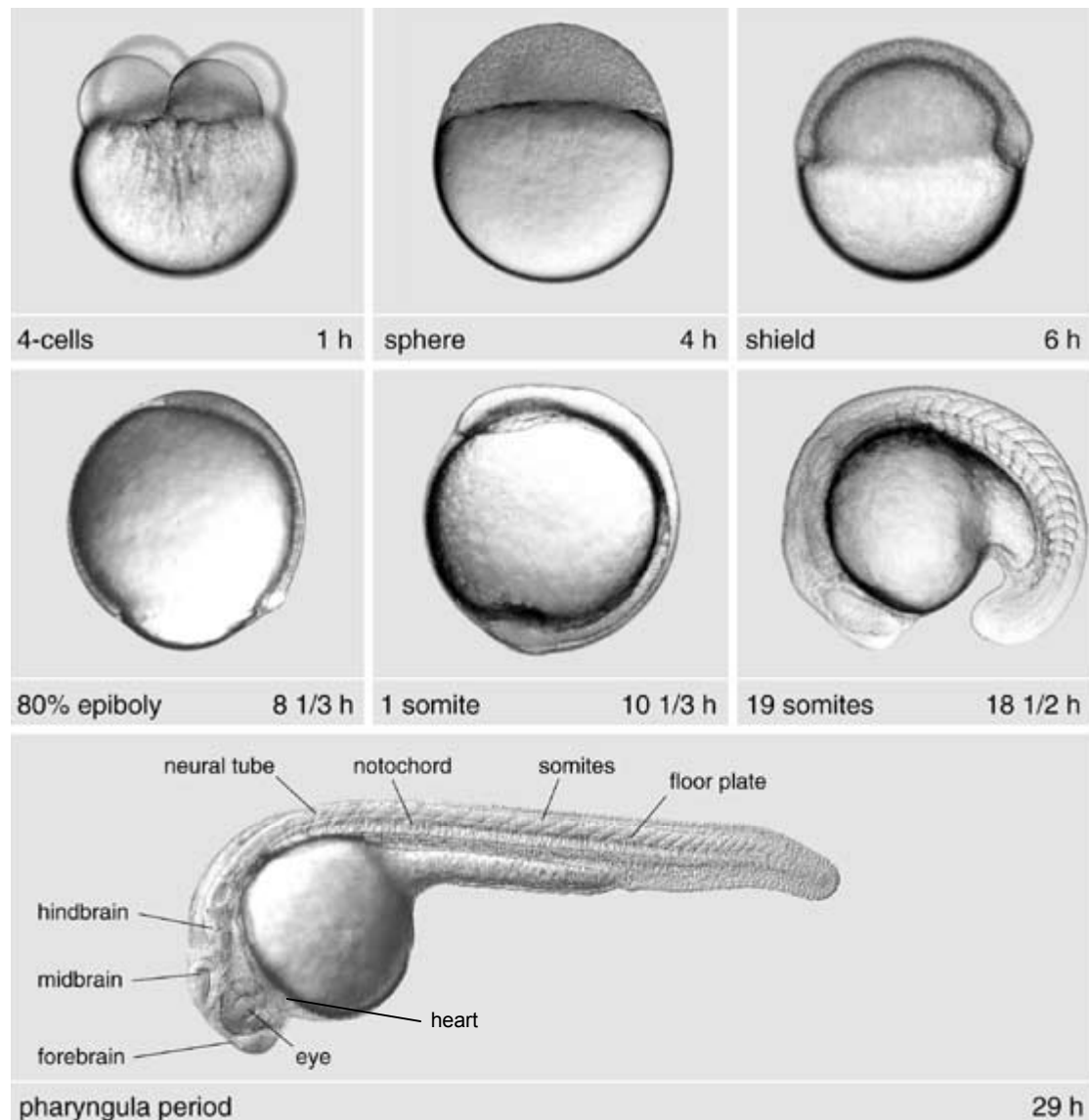


Abb. 1 Entwicklungsstadien des Zebrafischs [54]. Bei 29 hpf liegt das Herz als peristaltisch kontrahierender Herzschlauch vor, der sich bis 48 hpf zu einem sequentiell kontrahierenden Zweikammerherz entwickelt.

Die Herzvorläuferzellen stammen aus dem anterolateralen Plattenmesoderm (ALPM). Während oder kurz nach der Gastrulation sind diese bilateral entlang der Längsachse organisiert, migrieren zur Mittellinie und verschmelzen zu einem Herzschlauch, der kurz nach seiner Bildung, der sog. kardialen Fusion, beginnt, peristaltisch zu kontrahieren (Abb. 2). Der Herzschlauch besteht aus zwei durch Herzgallert getrennten Zellschichten, dem inneren Endokard und dem umgebenden Myokard, und ist von Beginn an streng organisiert. Von rostral nach kaudal ist der Herzschlauch unterteilt in den *Bulbus arteriosus* oder Ausflusstrakt (*outflow tract*, OFT), die zukünftige ventrikuläre Kammer, die zukünftige atriale Kammer und den *Sinus venosus* oder Einflusstrakt (*inflow tract*, IFT). Die zukünftige Position jeder

einzelnen Herzzelle im embryonalen Herzen ist bereits im ALPM festgelegt und kann durch spezifische Genexpressionsmuster verfolgt werden. Zusätzlich werden die Vorläuferzellen zwei verschiedenen Zellpopulationen zugeordnet, der ersten und zweiten Herzlinie. Die Zellen der ersten Herzlinie sind am Aufbau des IFT, des atrioventrikulären Kanals (AVC), des Ventrikels und des Atriums beteiligt, wohingegen die Zellen der zweiten Herzlinie zur Entwicklung des OFT, des Endokards und Teilen des Atriums beitragen [138].

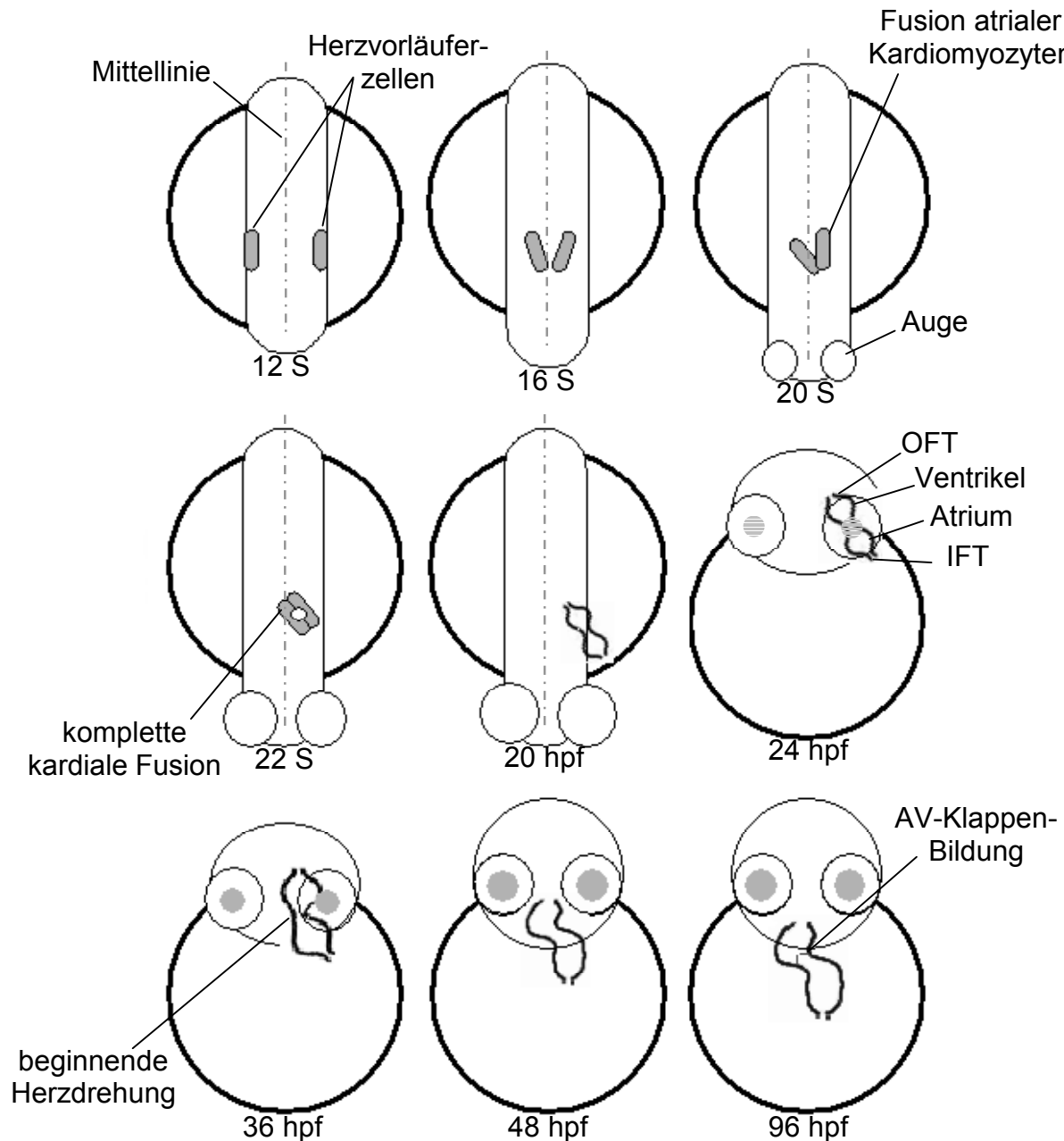


Abb. 2 Schematische Darstellung der Herzentwicklung im Zebrafisch vom 12 Somiten-Stadium (S) an bis 96 hpf. Dargestellt ist die zeitliche Abfolge der kardialen Fusion, Herzdrehung und Herzklappenbildung.

Wie bei der Entwicklung höherer Vertebraten beginnt sich das Herz des Zebrafischs nach der kardialen Fusion zu drehen, wodurch die spätere Position der Herzkammern festgelegt wird. Parallel zur Herzdrehung reifen die kontraktile Kardiomyozyten von Atrium und Ventrikel zu Kammerkardiomyozyten heran, entwickeln ein spezialisiertes Erregungsleitungssystem und beginnen zu proliferieren (Abb. 2) [134, 148].

Das frühembryonale Herz aller Wirbeltiere besteht aus zwei Kammern, einem Atrium mit dünnem Myokard und relativ dicker Herzgallertschicht und einem Ventrikel mit dickem und mehrschichtigem Myokard, bei dem das Herzgallert bereits durch subendokardiales Gewebe ersetzt wurde [35, 126, 133, 135]. Atrium und Ventrikel, die aus venösem Blut mit geringem Blutdruck arterielles Blut mit hohem Druck erzeugen, sind durch den AVC getrennt, der über verschiedene Mechanismen einen unidirektionalen Blutfluss sicherstellt [63]. Zum einen erzeugt er durch Bündelung und verzögerte Weiterleitung des elektrischen Erregungssignals eine sequentielle Kontraktion beider Kammern ausgehend vom IFT. Dies wird durch die elektrische Isolation der Kardiomyozytenpopulationen von Atrium und Ventrikel durch nichtleitendes Gewebe, dem sog. AV-Ring, erreicht. Das Erregungssignal wird mit Hilfe von Zellen mit verzögerter Erregbarkeit, die im sog. AV-Knoten organisiert sind, überbrückt. Zum anderen werden am AVC flexible AV-Klappen ausgebildet, die bei der ventrikulären Kontraktion den Blutrückfluss ins Atrium verhindern (Abb. 2) [94, 101, 126, 132, 134, 146, 152].

Bis zu diesem Schritt verläuft die embryonale Herzentwicklung in allen Vertebraten gleich. Während das Fischherz an diesem Punkt seine Entwicklung abgeschlossen hat und nur noch durch Zellteilung wächst, entwickeln Vögel und Säugetiere ein weiteres Kreislaufsystem. Dieser sog. pulmonale Blutkreislauf wird in einem zusätzlichen Schritt der Herzentwicklung durch komplette intraatriale und -ventrikuläre Septation (Säuger) bzw. ausschließlich intraventrikuläre Septation (Vögel) vom Körperkreislauf getrennt [94, 96].

3.2 Molekulare Marker der Herzentwicklung im Zebrafisch

Im 15 Somiten-Stadium sind die Kardiomyozytenvorläuferzellen bilateral im ALPM organisiert und zeichnen sich durch die Expression kardialspezifischer Transkriptionsfaktoren, wie *hand2*, *gata4*, *bmp4* oder *nkx2.5*, aus [30, 57, 126, 152]. Diese induzieren in den Kardiomyozytenvorläuferzellen die Expression kardialer

kontraktiler Proteine, wie cMlc1 oder cMlc2 [154, 157, 159]. Die Kardiomyozytenvorläufer sind in diesem Stadium innerhalb des ALPM bereits in atriale und ventrikuläre Populationen unterteilt. Die ventrikulären Zellen sind dabei durch die Expression von *vmhc* (*ventricular myosin heavy chain*) von den atrialen unterscheidbar [152-155].

Die Fusion der bilateral organisierten Kardiomyozytenvorläufer zu einem medialen Herzschauch erfordert eine komplexe Serie von spezifischen Zellbewegungen der einzelnen Zellpopulationen, wobei gestaffelt erst die zukünftigen ventrikulären und dann die zukünftigen atrialen Kardiomyozytenpopulationen fusionieren [117]. Die kardiale Fusion hängt u. a. von den Transkriptionsfaktoren Sox (Casanova, [6, 38, 76, 152]), Mix (Bonny and clyde, [77]), Hand2 (Han, [152]) und Gata5 (Faust, [85, 117]), Oep [49, 119] und dem Lysosphingolipid G-Protein gekoppelten Rezeptor (Mil, [134]) ab.

Von 33 hpf an können atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten durch die Expression von *vmhc* (*ventricular myosin heavy chain*) bzw. *amhc* (*atrial myosin heavy chain*) eindeutig voneinander unterschieden werden [152]. Über die molekularen Mechanismen, die zur Spezifikation der Kardiomyozyten in atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten führen, ist bisher nur wenig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass *hand2*, *gata5*, *fgf8* und *oep* die Bildung ventrikulärer Vorläuferzellen fördern. Eindeutig gezeigt wurde bisher aber nur die Rolle von Retinsäure und *bmp2* für die Balance von atrialer und ventrikulärer Spezifikation, welche wechselseitig die Entwicklung atrialer oder ventrikulärer Kardiomyozyten fördern bzw. inhibieren [107, 111, 134, 137, 156, 158]. Für ausdifferenzierte Kammerkardiomyozyten sind im Zebrafisch bisher keine molekularen Marker bekannt. In der Maus beginnen differenzierte Kammerkardiomyozyten nach ihrer Ausreifung, verschiedene Gene zu exprimieren, die den Zellzyklus und damit die Proliferation der Kardiomyozyten regulieren. Diese Gene, wie *anf* oder *cx40*, die nicht außerhalb der Kammern exprimiert werden, können dann als spezifische Marker für ausgereifte kontraktile Kardiomyozyten herangezogen werden [35]. Da die Kardiomyozyten des Zebrafischs jedoch nicht derart ausgeprägte Differenzierungsstadien erreichen wie die der Maus, und diese Gene dennoch exprimiert werden, können diese Gene nicht als Differenzierungsmarker für ausgereifte Kammerkardiomyozyten herangezogen werden.

3.3 Entwicklung des atrioventrikulären Kanals

Die Differenzierung des Herzschlauchs in Atrium und Ventrikel, Ein- und Ausflusstrakt und atrioventrikulären Kanal (AVC) erfordert ein komplexes Zusammenspiel spezieller und regional exprimierter Transkriptionsfaktoren. Deren Aufgabe besteht in der spezifischen Begrenzung, der Aktivierung bzw. Inhibierung von Differenzierungsprogrammen, die die Entwicklung der späteren Komponenten des Herzens regulieren. Die Entwicklung des AVC beginnt mit der regionalen Expression des *bone morphogenetic protein 4 (bmp4)* an der Grenze zwischen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten 36 hpf. Bmp4 induziert in den benachbarten endokardialen Zellen deren Differenzierung in sog. endokardiale *Cushion*-Zellen und steuert durch gezielte Regulation von Zellzyklusgenen und Proliferation der Kardiomyozyten die Herzdrehung und in Säugern die intraatrialen und -ventrikulären Septierungen. Während die Kardiomyozyten in den Herzkammern jetzt beginnen, zu Kammerkardiomyozyten zu differenzieren, werden regional begrenzt am AVC die Tbox-Transkriptionsfaktoren Tbx2 und Tbx3 induziert. Deren Aufgabe besteht in der Repression kammermyokardialer Gene, wie *anf* und *cx40*, und verschiedener Zellzyklusgene, wie *cyclinC* [56]. Dadurch entrinne die Kardiomyozyten des AVC dem Differenzierungsprogramm für Kammerkardiomyozyten und starten in Wechselwirkung mit weiteren Faktoren ein separates Differenzierungsprogramm, welches sich durch die ebenfalls regional begrenzte Expression von *versican* und *gata5* auszeichnet. Das Ziel dieses Differenzierungsprogramms ist die Entwicklung (1) des elektrisch isolierenden AV-Rings zwischen Atrium und Ventrikel, (2) des AV-Knotens und (3) der AV-Klappen.

Die Bildung der Herzklappen erfolgt durch einen speziellen Transdifferenzierungsprozess der endokardialen *Cushion*-Zellen, welche in einer sog. epithelial-zu-mesenchymalen Transformation (EMT) von Endothelzellen zu Mesenchymzellen transdifferenzieren. Dieser Prozess wird durch mehrere Mitglieder der *transforming growth factor* (TGF)-Familie reguliert, die durch Kommunikation zwischen Myokard und Endokard lokal begrenzt die EMT steuern [67, 74, 106, 123, 133]. Die transdifferenzierten endokardialen Zellen dringen in die extrazelluläre Matrix zwischen Myokard und Endokard ein und beginnen zu proliferieren. Von dieser Phase an beginnen sie, *notch1b* zu exprimieren, welches im weiteren Verlauf die Klappenbildung steuert [12, 119, 145].

3.4 Funktionelle Genomanalyse

Es wird angenommen, dass das durchschnittliche Vertebraten-Genom 30.000-40.000 transkribierte Gene enthält, die allerdings nur 0,5-5 % des gesamten Genoms darstellen. Das Hauptinteresse der Genomforschung liegt in der Identifikation und Analyse dieser i.d.R. für Proteine kodierenden DNA-Sequenzen. Zur funktionellen Genomanalyse, der Zuordnung von Genfunktionen zu im Rahmen verschiedener Genomprojekte identifizierten Genen, werden grundsätzlich zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Die Idee der *reverse genetic* liegt in der Identifizierung von Genfunktionen (Phänotypen) durch gezielte genetische Manipulation von bekannten Genen. In Maus und Zebrafisch konnten durch gezielte Mutagenese, transienten oder zeitlich gesteuerten Gen-*Knockdown* oder Überexpression verschiedene bekannte Gene manipuliert und damit deren Funktion in Vertebraten untersucht werden [21, 37, 51, 88, 149].

Die zweite Strategie, die sog. *forward genetic*, beruht auf der phänotypbasierten Identifikation von Gendefekten. Dabei werden in verschiedenen Organismen, wie Fliege, Maus oder Zebrafisch, Morphologie- oder Funktionsabweichungen vom Wildtyp mittels Kopplungsanalyse und positioneller Klonierung einem Gendefekt zugeordnet [10, 43, 44, 55, 105, 136]. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt vor allem darin, dass sowohl neue Genfunktionen, als auch regulatorische Sequenzen und neue Genklassen, wie die kürzlich entdeckte micro-RNA, identifiziert, sowie die beteiligten Signalwege analysiert werden können, da zufällig jeder Genlocus ohne Vorselektion verändert werden kann. Lediglich wenige chromosomale Regionen sind trotz unterschiedlicher Mutagenesemethoden schlecht zugänglich, wodurch Mutagenesebibliotheken lückenhaft sein können. Des Weiteren können solche Gene nur eingeschränkt charakterisiert werden, deren Inaktivierung durch die Funktion anderer Gene kompensiert wird oder einen zu frühen embryonalen letalen Phänotyp induziert. Während *forward genetic*-Mutagenese-Screens in Nicht-Vertebraten, wie in *Caenorhabditus elegans* und *Drosophila melanogaster*, bereits zur Entdeckung einer beeindruckenden Zahl neuer Gene und Signalwege geführt hat, sind derartige Versuche in Vertebraten wie der Maus bisher nur in kleinem Umfang erfolgreich gewesen [51].

3.5 Die Isolierung von *weiches herz*^{m245}

Da Ziel genomweiter gesättigter Mutagenese-Screens ist es, jedes Gen und jede regulatorische Sequenz eines Organismus zu manipulieren um sie funktionell zu analysieren. Anfangs wurden im Rahmen dieser *forward genetic*-Strategie im Zebrafisch Röntgen- oder γ -Strahlen und transposonbasierende, retrovirale oder Vesikular Stomatitis-virale Technologien als Mutagene erprobt. Da diese jedoch nur wenig erfolgreich waren, wurden fast alle Mutagenese-Screens mit chemischen Mutagenen durchgeführt [7, 9-11, 30, 69, 89].

Chemische Mutagene, wie Psoralen, das durch die Quervernetzung der DNA zu Deletionen von bis zu wenigen hundert Basenpaaren führt, oder Ethylmethansulfonat (EMS) und 1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff (ENU) (Abb. 3), welche durch die Alkylierung von Nukleotiden oder des Phosphatgrundgerüsts der DNA die Paarungseigenschaften der Nukleotide so verändern, dass sie bei der Replikation Punktmutationen induzieren, haben sich als deutlich effizienter herausgestellt [54, 55, 80, 105].

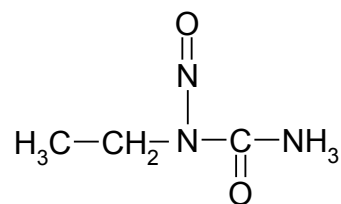


Abb. 3 Strukturformel für 1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff (ENU)

Weiches herz^{m245} (*whz*) wurde 1996 durch einen genomweiten ENU-Mutagenese-Screen in Boston erzeugt, indem adulte IndiaAB-Männchen mit ENU mutagenisiert und mit WIK- und TL-Wildtyp-Weibchen ausgekreuzt wurden. Durch klassische 3-Generationen-Auszucht (Abb. 4) wurden die ersten homozygot-mutanten *whz*-Embryonen isoliert und die Mutante als Herz-Kreislauf-Mutante charakterisiert [11, 39, 54].

3.6 Genetische Kartierung von Genen

Die genetische Kartierung von Genen beruht auf der genetischen Kopplung, welche 1911 durch Morgan und Sturtevant entdeckt wurde, die feststellten, dass die Mutationen *vestigal* und *purple* in *Drosophila melanogaster* nicht der Mendel'schen

Regel der freien Rekombinierbarkeit der Gene gehorchten, sondern gekoppelt vererbt wurden.

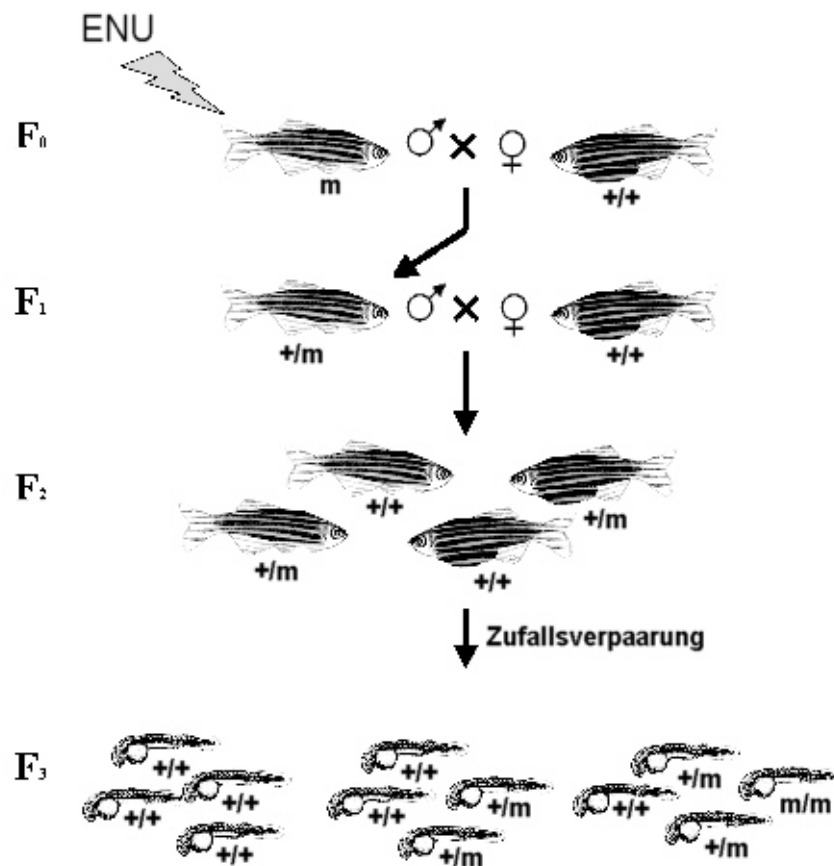


Abb. 4 Verpaarungsschema für klassische 3-Generationen-Auszucht [51]. Ausprägung des Phänotyps nur bei *m/m* (homozygot für mutagenisierten Locus). *+/m* (heterozygot für Mutation) und *+/+* (homozygot WT) sind phänotypisch unauffällig.

Durch Haldane (1919) wurden diese Beobachtungen in Kartierungsfunktionen umgewandelt. Da die Entkopplung vom Markern durch Rekombination zwischen zwei Schwesterchromatiden während der Meiose umso wahrscheinlicher wird, je weiter sie auf dem Chromosom auseinander liegen, ergibt sich die Entfernung gekoppelt vererbter Marker, Gene oder Mutationen aus dem Prozentsatz, mit dem diese nicht zusammen, sondern entkoppelt vererbt werden. Sie wird daher auf genetischen Karten in centiMorgan (cM, nach T.H. Morgan) angegeben (1 cM = 1 Rekombination in 100 Meiosen = 1 % Rekombination).

Als Kopplungsmarker auf genetischen Karten dienen in der Regel kurze DNA-Fragmente, wie Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Mini- und Mikrosatelliten-Polymorphismen oder zufällig von kurzen Primern amplifizierte polymorphe DNAs und polymorphe PCR-Produkte, die von repetitiven Sequenzen

ausgehend amplifiziert wurden und oft auch zwischen nah verwandten Stämmen polymorph sind [114, 124].

Das Prinzip der Genkartierung oder positionellen Klonierung eines Gendefekts beruht darauf, dass bei einem rezessiven Erbgang die Kopplung eines mutanten Phänotyps zum affizierten Chromosom verloren gehen kann, wenn das Chromosom mit seinem Schwesterchromosom homolog rekombiniert und dadurch partiell entkoppelt wird. Da in phänotypisch mutanten Tieren niemals über den Mutationslocus hinweg rekombiniert wird, können die entkoppelten Chromosomenfragmente des affizierten Chromosoms ausgeschlossen werden, was den Mutationslocus auf dem Chromosom eingrenzt. Je weiter entfernt das untersuchte Chromosomenfragment vom Mutationslocus ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination, wobei eine Rekombination in 100 untersuchten Meiosen (1 cM) einer Entfernung von etwa 1 Mb zum Mutationslocus entspricht.

3.7 Genetische Karten im Zebrafisch

Beim Zebrafisch steht zur Isolierung mutagenisierter Gene durch positionelle Klonierung eine exzellente genomische Wissensbasis zur Verfügung [51]. So existiert eine auf polymorphen Mikrosatelliten basierende, vollständige genetische Karte des Zebrafischgenoms [80-82, 160]. Sie beruht auf Längenunterschieden von Cytidin-Adenosin-Repetitionen, sog. CA-Mikrosatelliten. Die genetische Karte des Zebrafischgenoms besteht aus mehreren Tausend dieser CA-Marker und umfasst 25 Kopplungsgruppen, welche die 25 Chromosomen des Zebrafischs repräsentieren und eine genetischen Distanz von insgesamt 2300 cM umfassen, wobei die genetische Auflösung bei etwa 1 cM liegt.

3.8 Physikalische Kartierung im Zebrafisch

Ist einer Mutation ein genetisches Intervall auf einer Kopplungskarte zugeordnet, muss zur Isolierung des mutagenisierten Gens dieses Intervall physikalisch kartiert, d.h. mit physikalischen DNA-Fragmenten (z.B. *bacterial-* oder *yeast artificial chromosomes*, BAC bzw. YAC) überbrückt und anschließend mit Sequenzinformation gefüllt werden. Abhängig vom genetischen Abstand der flankierenden Marker wird die erste physikalische Karte mit einer mehr oder weniger geringen Auflösung

erstellt. Dazu wird durch die Isolierung von überlappenden Klonen aus DNA-Banken mit großer Insertgröße, wie YAC-Bibliotheken, das genetische Intervall überspannt. Sequenzinformationen aus den YAC-Enden werden dann zur Entwicklung neuer Primerpaare (Sonden) und Marker genutzt, mit denen DNA-Banken mit weniger großen Inserts, wie BAC-, *phagemid artificial chromosome*(PAC)- und Cosmid(COS)-Bibliotheken, analysiert werden, deren End-Sequenzen wiederum als Marker oder Sonde dienen können. Aus den so fortlaufend identifizierten Klonen kann eine immer feinmaschigere physikalische Karte des Mutationsintervalls erstellt werden, wobei durch neue polymorphe Marker das Intervall sowohl auf der genetischen, als auch auf der physikalischen Karte weiter eingengt werden kann [114].

Für die physikalische Kartierung beim Zebrafisch stehen mehrere YAC-Bibliotheken [8, 160], eine Vielzahl von BAC- und PAC-Bibliotheken [8, 48, 65, 66] und eine COS-Bibliothek [26] zur Verfügung, die frei erhältlich sind und zusammen das Zebrafischgenom etwa 30fach abdecken.

Eine weitere Möglichkeit zur physikalischen Kartierung des Zebrafischgenoms bieten sog. *radiation hybrid*(RH)-Karten, welche auf ionischer Fragmentierung des Zebrafischgenoms und der zufälligen Verteilung dieser Fragmente auf eine Vielzahl von Zellhybriden basiert. Jeder Locus des Genoms ist dabei durch mehrere Zellhybride repräsentiert. Der Abstand zwischen zwei Loci wird durch den Grad der Übereinstimmung zwischen den positiven Zellhybriden bestimmt und in centiRay (cR) ausgedrückt. Die verfügbaren RH-Karten basieren auf der genetischen Karte des Zebrafischgenoms und enthalten bereits viele tausend offene Leserahmen und annotierte Gene [48, 65, 66].

Darüber hinaus stehen zur physikalischen Kartierung mehrere aus kurzen genomischen Sequenzen (*whole genome sequences*, WGS) assemblierte Versionen der Sequenz des Zebrafischgenoms zur Verfügung (Ensemble, Sanger Centre, UK). Anfangs sehr lücken- und fehlerhaft, hat sich die Qualität des Ensemble in den letzten Jahren deutlich verbessert, was zuletzt auch auf die Einbeziehung von BAC- und PAC-Datenbanken zurückzuführen ist.

3.9 Tbx20 - Ein Mitglied der Tbox-Genfamilie

Die Familie von Tbox-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Unterfamilien, Tbx1, Tbx2, Tbx6, Tbr1 und T, die sich im Laufe der Evolution durch Genduplikation entwickelt und differenziell spezialisiert haben und sowohl in Vertebraten, als auch in

Nicht-Vertebraten isoliert wurden (Abb. 5). Das gemeinsame Merkmal aller Tbox-Gene ist eine etwa 200 Aminosäuren lange und hoch konservierte DNA-bindende Domäne, die T-box, welche spezifisch an sog. Tbox-Bindungselemente (TBE) mit der Konsensussequenz TC**ACACCT** bindet, wobei die Affinität jedes Tbox-Gens von der Anzahl und Orientierung der TBE-Kernmotive abhängt [150, 151].

In Vertebraten sind mehr als 20 Mitglieder der Tbox-Transkriptionsfaktorfamilie bekannt (Tab. 1). Alle charakterisierten Tbox-Gene nehmen Schlüsselrollen in Zelltypspezifikationen und –differenzierung ein und regulieren die Gewebespezifikation und Morphogenese des Gewebes, in dem sie exprimiert werden [4, 18, 104]. Tbox-Gene sind ausschließlich nukleär exprimiert [98] und fungieren als transkriptionelle Aktivatoren, Co-Aktivatoren, Repressoren und/oder Co-Repressoren.

Die kardiale Expression von *tbx1*, *tbx2*, *tbx3*, *tbx5*, *tbx18* und *tbx20* während der embryonalen Entwicklung lässt eine kritische Rolle dieser Gene in der Herzentwicklung und –funktion vermuten. Bis heute werden allerdings nur Tbx1 (DiGeorge-Syndrom) und Tbx5 (Holt-Oram-Syndrom) mit humanen Herzentwicklungsstörungen in Zusammenhang gebracht [17, 46, 83, 103, 122, 142].

Klasse	Gen	Expression
Brachyury	<i>brachyury</i> <i>tbx19</i>	Schwanzende, Wirbelsäule, <i>primitive streaks</i> Hypophyse
T-brain I	<i>t-Brain I</i> <i>t-Brain2</i> <i>tbx21</i>	Hirnrinde Trophoblast, Hirnrinde Lunge, Milz
Tbx1	<i>tbx1</i> <i>tbx10</i> <i>tbx13</i> <i>tbx14</i> <i>tbx15</i> <i>tbx18</i> <i>tbx20 (tbx12)</i> <i>tbx22</i>	Herz, Schlund Gesichtsschädel, Gliedmaßen Herz, Somiten, Gliedmaßen Herz, Augen, Gehirn, Aorta, Gliedmaßen Fetus
Tbx2	<i>tbx2</i> <i>tbx3</i> <i>tbx4</i> <i>tbx5</i>	Gliedmaßen, Herz Gliedmaßen, Herz Allantois, hintere Gliedmaßen Herz, vordere Gliedmaßen
Tbx5	<i>tbx6</i>	Schwanzende, <i>primitive streaks</i>

Tab. 1 Mitglieder der Tbox-Genfamilie und deren Expressionsmuster [150].

Mutationen im transmyokardial exprimierten, jedoch verstärkt am AVC lokalisierten *tbx5*, die die transkriptionelle Funktion des Proteins beeinflussen, verursachen autosomal dominante atriale und ventrikuläre Septumdefekte, Signalweiterleitungsstörungen am AVC (AV-Blöcke) und Herzmorphogenesedefekte [24, 112]. In verschiedenen Tiermodellen (Zebrafisch, Maus) wurde gezeigt, dass homozygote Mutationen von *tbx5* embryonal letal sind. Mutationen in *tbx1*, welches im Aortenbogen und OFT exprimiert wird, erzeugen ebenfalls im heterozygoten Zustand schwere Morphogenesedefekte des kardialen Ausflusstraktes, u. a. im Rahmen der Fallot-Tetralogie. Wie bei *tbx5* sind homozygote Mutationen von *tbx1* embryonal letal.

Homozygote *tbx2*-Defekte, welche in verschiedenen Tiermodellen zu embryonal letalen Herzmorphogenesedefekten führen [3, 36, 56, 110], sind beim Menschen mit einigen Brustkrebsarten assoziiert. Dabei wurde festgestellt, dass Tbx2 verschiedene Zellzyklus- und Tumorsuppressorgene, wie p19 and p14, transkriptionell reguliert [73, 90].

3.10 Die Rolle von Tbx20 in der Herzentwicklung

Tbx20 (syn. Tbx12, H15, Midline, Hrt, Neuromancer1) ist ein Mitglied der Tbx1-Unterfamilie und besteht aus einer N-terminalen Protein-Protein-Interaktionsdomäne, der hoch konservierten Tbox-Domäne, einer großen transkriptionellen Aktivator-domäne und einer kürzeren C-terminalen transkriptionellen Repressordomäne (Abb. 5) [5, 97].

Die Expression von *tbx20* ist bereits sehr früh im vorderen und hinteren Mesoderm und der Stammhirn-Region nachweisbar. Im Laufe der Entwicklung bleibt die Expression von *tbx20* im vorderen mesodermalen Herzfeld, den Kardioblasten und ausdifferenzierten Kardiomyozyten erhalten, so dass es in allen Stadien der Herzentwicklung exprimiert wird. Im embryonalen Herzen ist *tbx20* zwar transkardial exprimiert, zeigt allerdings in Mausherzen im mesenchymalen Gewebe des AVC und OFT eine verstärkte Expression [23, 68, 84, 111]. Zusätzlich wird *tbx20* in der dorsalen Aorta, dem Stammhirn, den Motoneuronen und dem Schwanzende exprimiert. In embryonalen Mehrkammerherzen von Vögeln und Säugern ist *tbx20* in den intraventrikulären Septen und den endokardialen Übergängen von AVC und OFT lokalisiert [129, 141].

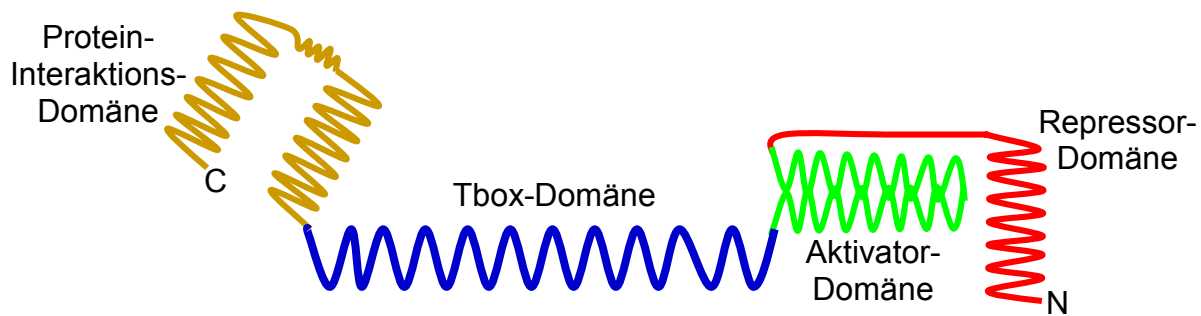


Abb. 5 Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Tbox20.

Weitere Isoformen von Tbx20, denen die transkriptionalen Regulatorelemente fehlen, sind weniger restriktiv exprimiert und haben keine bisher bekannte Funktion [137, 141].

Es wurde gezeigt, dass *tbx20* im embryonalen Herzen durch Retinsäure, Bmp-2, SHH, Gata4, Flh und Nkx2.5 induziert [99, 113, 141] und durch Neuregulin reprimiert werden kann [138]. Des Weiteren ist gezeigt worden, dass Tbx20 über seine N-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne physikalisch mit Nkx2.5, Gata4, Gata5, Tbx5 und Isl1 interagieren kann, wobei diese Interaktionen teilweise von intakter DNA-Bindung durch Tbx20 und/oder seines Bindungspartners abhängig ist [24, 137, 141].

In der Literatur beschriebene Zielgene von Tbx20 sind *anf*, *bmp2*, *bmp4*, *bmp5*, *chisel*, *cx40*, *cx43*, *fgf10*, *hand1*, *hand2*, *hey2*, *ibe*, *isl1*, *irx4*, *mads*, *mef2c*, *myH7*, *myl2v*, *nkx2.5*, *odd*, *pitx2c*, *tbx2*, *tbx3*, *tbx5*, *tnc*, *wg* und *wnt11* [23-25, 27, 84, 97, 99, 111-113, 116, 129, 137, 138, 141, 151], wobei für *nkx2.5*, *fgf10*, *Pitx2*, *bmp4*, *tbx5* und *isl1* widersprüchliche Daten existieren [113, 116, 129, 138, 140, 141].

Wie aufgrund der frühen kardialen Expression von *tbx20* erwartet, induziert Tbx20 im Frosch mesodermale und endodermale Zelldifferenzierungen und die koordinierte Migration der kardialen Vorläuferzellen [138]. In Anlehnung daran zeigt der *tbx20(nmr1)*-Knockout-Phänotyp in *Drosophila melanogaster* Defizite in der myokardialen Zellassemblierung, der kardialen Fusion und der Polarisierung der Kardiomyozyten innerhalb des Herzschlauchs, was insgesamt zu leicht pathologischen Herzphänotypen, nicht aber zum embryonalen Tod führt [113]. Im Gegensatz dazu ist der homozygote *tbx20-Knockout* in der Maus embryonal letal. Der kardiale *tbx20-Knockout*-Phänotyp wird allerdings widersprüchlich beschrieben. Während Cai et al. [27] von einer gestörten Kardiomyozytenspezifikation und -differenzierung ausgehen, die zu starken Störungen in der Herzentwicklung führen,

fanden Takeuchi et al. [141], Stennard et al. [138] und Singh et al. [129] keine Hinweise auf Defizite in Zellspezifizierung oder –migration. Sie beobachteten starke Morphogenesedefekte mit verkleinerten primären Ventrikeln, vergrößerten oder vom Ventrikel abgeschnürten OFT-ähnlichen Kammern, den Verlust des Herzloopings und insgesamt normale Atria. Die Entwicklung des AVC im *tbx20-Knockout* wurde bisher noch nicht hinreichend untersucht. Widersprüchliche Ergebnisse existieren bezüglich der Ursache für die verkleinerten Ventrikel in *tbx20-Knockout*-Mäusen: während der *tbx20-Knockout* mittels siRNA-Technologie bei normalen Proliferationsraten verstärkte Apoptose induziert [141], führt der komplette *tbx20-Knockout* durch Insertionsmutagenese oder cre-lox-Technologie zu signifikant reduzierten Proliferationsraten bei unveränderten Apoptoseraten [27, 129, 138]. Außerdem wurde ein autosomal dominanter kardialer Phänotyp beobachtet, der durch verringerte Kontraktilität und verstärkte ventrikuläre Fibrosierung charakterisiert ist [138]. Dies deutet darauf hin, dass Tbx20 mit dem Krankheitsbild der Dilatativen Kardiomyopathie assoziiert ist.

4 Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1 Geräte

Artemia Schlupfanlage	Schwarz
Autoklav	Systec
Ausströmerstein, Dae Yank	Schwarz
Bildwandler MCU II	Kappa
Binokular MZ 125	Leica
DM IRB	Leica
AxioSkop 2 plus	Zeiss
Brutschrank Bakterieninkubator	Heraeus
HeraCell	Heraeus
DCD Kamera DC 500	Leica
CF 14/4 MC	Kapfa
Axiocam MRC	Zeiss
Elektroporator	Biorad
Framegrabber VS-USB 2800D	V-Stream
Gefrierschränke Premium	Liebherr
Geldokumentation Rechneinheit	MWG Biotech
Ständer RS I	Heiser
Gelelektrophoresekammern, groß, mittel	PeqLab, Biometra
Agagel Maxi	Biomed. Analytik GmbH
Multiphorkammern	Pharmacia
Heizstäbe, Titan-Heizer 300 W	Schwarz
Hitzeversiegler	Stratagene
Hybridisierungsöfen	WTC Binder
Injektionsapparatur Femtojet	Eppendorf
Kaltlichtquelle 1500 LCD	Schott
Kapillarenzieher PC-10	Narishige
Konfokalmikroskop	Leica
Kühlschränke	Liebherr
Lightcycler	Roche

Magnetrührer	Omnilab
Mausboxen 3 L, 5 L	Schwarz
Mausdeckel für 3 L und 5 L Boxen	Schwarz
Mikrotom RM 2145	Leica
HM340 E	Micron
Mikrowelle	Bosch
Multipipetten, elektrisch, Kainin 250, 1000	Eppendorf
Mechanisch, Multipette plus	Eppendorf
Pasteurpipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Neolab
pH-Meter 2001 C	Schwarz
pH 211	Hanna Instrument
Planktonkollektor	Schwarz
Reinstwasseranlage Milli-Q-Plus	Purelab Plus
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Schlauchpumpe P1	Pharmacia
Schüttelinkubator	Heraeus
Schüttler SM-30 control	Edmund Bühler GmbH
Polymax 1040	Heidolph
Thermoschüttler <i>comfort</i>	Eppendorf
Spannungsquellen	Biometra
EPS 600	Phamacia
Thermocycler, PTC-100	MJ Research
Thermopumpe Multitemp III	Pharmacia
UV Tisch	Fischerbrand
UV-Lampe ebq-100	Kübler
Ultraschallbad	Elma
Videogerät	Grundig
Vortex-Hochgeschwindigkeitsmischer	Werner Hassa GmbH
Waagen Analysenwaage	Kern
Feinwaage CP 124 S	Sartorius
Wasserbad Isotemp 2	Fischer Lifescience
1092	GFL

Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
	Tischzentrifuge	Faust
	Labofuge 400	Heraeus

4.1.2 Software

ClustalW	EmbNet
Cromas	Adrian TNT
Endnote	Thomson
Excel	Microsoft
Powerpoint	Microsoft
Photoshop	Adobe
Premiere	Adobe
Primer 3	Whitehead Inst. for Biomedical Research
PVR plus	Ulead
Word	Microsoft

4.1.3 Datenbanken

Ensemble zV2, zV3, zV4, zV5	www.sanger.ac.uk
SSAHA	www.sanger.ac.uk
Pubmed	www.ncbi.nlm.nih.gov
Zfin	www.zfin.org
Vega	vega.sanger.ac.uk/Danio_rerio/blastview

4.1.4 Gebrauchsmaterialien

Drigalski-Spatel/Glasstäbe	Neolab
Duranglasgefäße	Schott
Mehrkanalpipetten 0,5-10 µL, 2,5-25 µL, 25-250 L	Brand
Mikropinzetten, Gr. 1; 55	Neolab
Mikropipetten 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL	Eppendorf
Objektträger	Neolab
Pipettierhilfe acu-jet	Brand
Mechanische Pipettenpumpe	Bel-Art Products

Präparierbesteck

Neolab

Präpariernadel

Neolab

4.1.5 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie

Neolab

Deckgläschen

Neolab

Elektroporationsküvetten, 1 mm

Biorad

Frischhaltefolie

Toppits

Gelträgerfolie Gel-Fix für PAA-Gele

Serva

Gewebekulturschalen, 15 mm, steril

Greiner Bio-one

Glaskapillaren, dünn, 1,0 mm

World Precision Instruments

Glasplatten, 6 mm

Glas Hlawatsch

Klebefolien für Mikrotiterplatten

Qiagen

Lightcyclerkapillaren

Roche

Objektträger Menzel

Neolab

Pasteurpipetten Plastik

Neolab

Glas

Fischer Lifesciences

PCR-Platten, 96 wells

Steinbrenner

Petrischalen

Greiner bio-one

Pipettenspitzen

Starlab GmbH

Plastikfiltratflaschen 100 mL, 250 mL, 1 L

Nunc Nalgene

Plastikpipetten (5 ml, 25 ml)

Sarstedt

Puderfreie Nitrilhandschuhe

Roth

Puderfreie Untersuchungshandschuhe

BSU, medical

Rasierklingen

Apollo

Reaktionsgefäße 0,2 mL, 1,5 mL, 2 mL

Eppendorf

Rundbodenröhrchen 14 mL

Becton Dickinson Labware

Skalpelle, Einweg

Feather

Spitzbodenröhrchen 15 mL, 50 mL

Greiner bio-one

Spritzen + Kanüle

Becton & Dickinson

Sterilfilter FP30/0,2 CA-S

Schleicher & Schuell

Verschlussfolie „Parafilm“

Dechiney, Plastic Packaging

Versiegelungsfolie Mikrotiterplatte

AB-Gene

Zellkulturplatten 6, 12 und 24 Loch
Zellkulturplatten 6, 12 und 24 Loch

Nunc Nalgene
Nunc Nalgene

4.1.6 Chemikalien

Aceton, p.A.	AppliChem
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bis-Acrylamid	Serva
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Calciumnitrat	AppliChem
Chloroform	Sigma
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth
Eisessig, p.A.	AppliChem
Eiweißglycerin	Waldeck GmbH
Entellan	Merck
Ethanol, p.A.	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid	Invitrogen
Glycerin, wasserfrei	AppliChem
Glycin	Sigma
HEPES	Roth
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Grüssing
LB-Agar	Fluka
LB-Broth	Fluka
Lithiumchlorid	Grüssing
LMP-Agarose	Gibco
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Sigma

MESAB, 3-amino-benzoic acid ethyl ester	Sigma
Methanol	Merck
Methylcellulose	Fluka
Methylenblau	Sigma
Natriumcarbonat	Grüssing
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat (Tri-Natriumcitrat) dehydriert	AppliChem
Nonident P40	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Neolab
Natriumhydroxid	Sigma
Paraformaldehyd	Fluka
Phenolrot	Sigma
Phenylthiocarbamid (Phenylthiourea, PTU)	Sigma
Polyacrylamid	Serva
Salzsäure, konzentriert (HCl)	Sigma
Silane	Amersham Bioscience
TEMED	Sigma
Trichloressigsäure	Roth
Triton X-100	Roth
Tris	Roth
Tween-20	Fluka
Wasserstoffperoxid, 30% (w/v)	Merck
Xylencyanol	USB

4.1.7 Lösungen und Reagenzien

10 x TBE-Puffer	Sigma
Aqua injectabilia	Braun Melsungen AG
Benzoyl Peroxid	Polysciences, Inc.
Bovine serum albumin, BSA	Sigma
100x BSA	NEB
DMEM	Sigma
Heparin, Natriumsalz	Sigma
IPTG	Sigma

JB-Solution A (Monomer)	Polysciences, Inc.
JB-Solution B (Accelerator)	Polysciences, Inc.
NBT/BCIP Stock Lösung	Roche
SOC-Medium	Invitrogen
Trizol	Invitrogen
X-Gal	Sigma

4.1.8 Immunologische Materialien

4.1.8.1 Mediensupplemente

Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Methylenblau	Signal
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen

4.1.8.2 Inhibitoren

Isoptin (Verapamil, Ca ²⁺ -Kanal-Blocker)	Abbott
SU5402 (FGFR-Inhibitor)	Leger und Brand

4.1.8.3 Antikörper und Farbstoffe

Anti-Nexilin, mouse IgG1	BD Bioscience
Anti-Digoxigenin, alkalische Phosphatase-gekoppelt	Roche
Anti-Fluorescein, alkalische Phosphatase-gekoppelt	Roche
Anti-Tbx20, rabbit Ig	Orbigene
Digoxigenin-Labeling-Mix	Roche
Eosin	Sigma
Fluorescein-Labeling-Mix	Roche
Fluospheres	Molecular Probes
Goat-anti-mouse IgG1, Fluorescein-gekoppelt	Southern Biotechnology
Goat-anti-mouse IgG2b, Rhodamin-gekoppelt	Southern Biotechnology

Goat-anti-rabbit IgG, Fluorescein-gekoppelt	Southern Biotechnology
Hämatoxylin	Sigma
MF20 (anti-myosin), mouse IgG2b	DSHB
S46 (anti-atrial myosin), mouse IgG	Frank Stockdale
Siriusrot	Niepötter

4.1.8.4 Peptide und (Oligo-)Nukleotide

Fetales Kälberserum	PAI
Morpholinos (antisense-Oligonukleotide)	Gene-Tools
Primer	MWG-Biotech/Metabion
Schafserum	PAI
Spermidine	Sigma
Torula RNA	Sigma

4.1.9 Molekularbiologische Materialien

CybrGreen	Roche
DNA-Größenstandard 100 bp, 1 kb	New England Biolabs
DNase I	Boehringer Mannheim
dNTP Mix 25 mM	Roche
DTT, 0,1 M	Invitrogen
High-fidelity DNA Polymerase	Stratagene
Lysozym	Applichem
Protease	Sigma
Proteinase 20 mg/ml	Roche
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase-Inhibitor RNA-guard	Amersham
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Boehringer Mannheim
Sp6-Polymerase	Roche
Superscript II, reverse Transkriptase	Invitrogen
T3-Polymerase	Roche
T4-Ligase	Roche

T7-Polymerase	Roche
Taq-Polymerase	Qiagen, Molzym

4.1.9.1 Plasmide

pCRII-TOPO	Klonierungsvektor
pGEM-T easy	Klonierungsvektor
pRML1	YAC
pRML2	YAC
pCS2plus	Expressionsvektor
pCS2plus mlc2::GFP	Kardialsp. Expressionsvektor
pCMV	Expressionsvektor
pTARBAC2.1	BAC
pCYPAC2	PAC

4.1.9.2 Kits

ApopTag <i>in situ</i> Apoptosis Detection Kit	Intergen
Expand long Template PCR System	Roche
mMessage mMachine SP6, T3, T7	Ambion
pGEM T-easy system I	Promega
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiaprep Spin Miniprep kit	Qiagen
Qiaquick gel extraction kit	Qiagen
Qiaquick nucleotide removal kit	Qiagen
Titan One Tube RT-PCR Kit	Roche
Topo TA Cloning kit	Invitrogen
Ultraprep	Molzym

4.1.9.3 Morpholino antisense-Oligonukleotide

MO- <i>amhc</i>	ACTCTGCCATTAAAGCATCACCCAT
MO- <i>bmp4</i>	CAGCATTCGATTACCAGGAATCATG
MO- <i>fgf8</i>	GAGTCTCATGTTTATAGCCTCAGTA

MO- <i>zgc</i>	GGCTGTCAACTGTACCCTGGTCCAT
MO- <i>tbx5</i>	GAAAGGTGTCTTCACTGTCCGCCAT
MO1- <i>tbx20</i>	GGGAAGAGGTGTACTCCATGACGC
MO2- <i>tbx20</i>	TCAACACTTTCCTACAGCAAAAAT

4.1.10 Puffer und Lösungen

AHC (-Agar), 1 L	6,7 g Yeast Nitrogen Base + Ammoniumsulfat, 20 g Casamino Säure, 40 mg Adeninhemisulfat, 100 µL 12 N HCl, (30 g Agar), 100 mL sterilfiltrierte 40 % Dextrose
Blockingbuffer 1	5 % Schafserum, 0,2 % BSA in PBT
Blockingbuffer 2	10 % FCS in PBDT
Blockingbuffer 3	1,5 % FCS in PBDT
Danieau's Puffer	58 mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,6 mM Ca(NO ₃) ₂ , 0,4 mM MgSO ₄
Dent's-Bleach	30 % H ₂ O ₂ (30 %ig), 20 % DMSO, 50 % Methanol
Dents-Fix	80 % Methanol, 20 % DMSO
DMEMc	500 mL DMEM, 50 mL FCS Gold, 5 mL L-Glutamin, 5 mL Penicillin/Streptomycin
E3-Puffer	5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl ₂ , 0,33 mM MgSO ₄
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 25 % 20x SSC, 5 mg/mL torula RNA, 50 µg/mL Heparin, 0,1 % Tween 20
Infiltrating-Solution	100 mL JB4-Solution A, 1,25 g Benzoylperoxid
Ladepuffer (Agarose)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerol
Ladepuffer (PAA)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 50 % Formamid
Lysepuffer, 1L	10 mL 1 M Tris-HCl pH 8,3, 50 mL 1 M KCl, 3 mL Tween 20, 3 mL Nonident P40
Lysozym-Lösung	10000 u Lysozym, 0,5 mL Glycerol, 0,5 mL KPO ₄ -Puffer pH 7,5
NTMT, 50 mL	5 mL 1 M Tris-HCl pH 9,5; 2,5 mL 0,2 M MgCl ₂ , 1 mL 5 M NaCl, 50 µL Tween 20
PAA-15 %, 1 L	7,1 g Bis-Acrylamid, 142,5 g Acrylamid, auf 1 L mit 1x TBE
PAA-7,5 %, 1 L	2,25 g Bis-Acrylamid, 72,5 g Acrylamid, auf 1 L mit 1x TBE
4 % PFA in PBS	4 % PFA in H ₂ O auf 70 °C erhitzen und mit 0,1 M NaOH titrieren, bis alles gelöst ist
PBDT, 100 mL	10 mL 10x PBS, 1 mL DMSO, 100 µL Tween 20
PBS, 2 L	16 g NaCl, 0,4 g KCl, 2,88 g Na ₂ HPO ₄ , 0,48 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBSBT, 1 L	100 mL 10x PBS, 1 mL Tween 20, 2 g BSA
PBT	1x PBS, 0,1 % Tween 20

Pronase	1 g Protease in 50 mL, 4 h 37 °C
Proteinase K-Lösung 10 mg/mL	1 mL 10 % Sarcosyl, 9 mL 0,5 M EDTA pH 8, 10 mg Proteinase K
PTU, 100x	20 mM Phenylthioharnstoff
SCE-Lösung, 0,1 L	18,2 g Sorbitol, 5 mL Natriumcitrat, 2 mL 1 M EDTA pH 8
SSC 20x, 1 L	175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat, pH 7,0
TBE, 10x, 1 L	121,1 g Tris, 3,72 g EDTA, 51,53 g Borsäure, pH 8

4.1.11 Fischlinien

AB

TL

TüAB

TüAB *fli1::GFP*

TüAB *mlc2::GFP*

WIK

4.2 Methoden

4.2.1 Makroskopische und mikroskopische Methoden

4.2.1.1 Fischzucht

Die Fischzucht erfolgt unter konstanten Wasserbedingungen (pH 7,2-7,5; 400-500 μ S), welche durch das Mischen von VE-Wasser mit Meersalz und einer gesättigten Na_2CO_3 -Lösung (Stock B) und der Verwendung eines Biofilters mit Clear-Flo aufrecht erhalten und kontinuierlich beobachtet wird (4 L Stock B, 80 g Meersalz pro 1,5 m^3 VE-Wasser). Zusätzlich wird das Systemwasser monatlich auf die Funktion des Biofilters (Nitrat/Nitrit/Ammoniak) und auf weitere Belastungen hin untersucht. Die Fische unterliegen einem konstanten 13/11 h Tag-Nacht-Zyklus, wodurch eine natürliche Umwelt simuliert wird. Außerhalb der Tag-Phase können anfallende Tätigkeiten in der Fischanlage unter Rotlicht durchgeführt werden, das von den Fischen nicht wahrgenommen wird. Die Fütterung der adulten Fische erfolgt 2x täglich mit lebenden Artemia-Shrimps oder Tetra-Trockenfutter.

Zur Verpaarung werden die Fische am Nachmittag zuvor in Verpaarungstanks überführt, in denen Männchen und Weibchen durch ein Sieb vom Boden getrennt und (teilweise) durch eine Trennwand voneinander separiert sind. Bis 3 h nach Beginn der Tag-Phase am nächsten Tag werden die Trennwände entfernt. Nach max. 30 Minuten können dann die Eier in E3-Puffer gesammelt werden.

Die Embryonen werden bei 28,5 °C in E3-Medium mit Methylenblau (fungizid, bakterizid) oder 1:50 Streptomycin/Kanamycin großgezogen. Zur Unterdrückung der Pigmentbildung zu Dokumentationszwecken wird dem E3-Medium 100x PTU 1:100 verdünnt zugegeben. Nach 7 Tagen werden die Embryonen in das Aufzuchtssystem gegeben, die ersten 10 Tage ohne und danach mit stetig steigendem Wasserfluss. Die Fütterung beginnt nach 7 Tagen mit mikrodekapsylierten und getrockneten Artemia-Shrimps der Größe 0 und nach weiteren 10 Tagen mit dekapsylierten Artemia-Shrimps der Größe 1 und mit lebenden Artemia.

Die Aufzucht der lebenden Artemia erfolgt in trichterförmigen 15 L Plexiglastanks unter einer starken Lichtquelle. Dazu werden 20 g Artemia-Eier in 10 L VE-Wasser mit 360 g Meersalz unter ständiger Luftzufuhr für 48 h bei konstanten 28 °C inkubiert. Die lebenden Artemia-Shrimps werden anschließend in

einem Planktonkollektor gesammelt, von den verbleibenden Kapseln getrennt und verfüttert.

4.2.1.2 Foto- und Videodokumentation

Die Embryonen werden zusammen mit 2,5 % Methylzellulose in die Mulde eines Objektträgers gegeben und darin mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet. Die Fotodokumentation erfolgt am Leica-Stereomikroskop oder am Zeiss-Stereomikroskop AxioSkop. Je nach Zielsetzung können dabei Durchlichtaufnahmen (meist lebende Embryonen) oder Hellfeldaufnahmen (meist fixierte und gefärbte Embryonen) mit separater Lichtquelle durchgeführt werden. Danach werden lebende Embryonen in E3 und fixierte Embryonen in PBS gewaschen. Zur Videodokumentation werden die Embryonen mit Hilfe der Videokamera Typ CF 15/4 MC von Kafka mindestens 10 Sekunden gefilmt.

4.2.1.3 Präparation von embryonalen und adulten Zebrafischherzen

Die Präparation von Zebrafischherzen erfolgt nach Anästhesierung der Embryonen/Fische mit MESAB unter dem Leica-Stereomikroskop. Bei adulten Fischen wird der Brustkorb mit Hilfe von Präparierbesteck geöffnet und das Herz mit feinen Pinzetten herausgelöst. Zebrafischembryonen müssen erst mit einer Mikropinzette fixiert werden. Anschließend wird mit einer zweiten Pinzette das Perikard entfernt und das Herz herausgelöst. Je nach Anwendung werden die Herzen zur RNA-Gewinnung direkt in Trizol überführt oder für histologische Untersuchungen in 4 % PFA fixiert.

4.2.1.4 Injektion von Oligonukleotiden in Zebrafischembryonen

Zur Vorbereitung der Mikroinjektion werden aus 3 % Agarose in E3 Injektionsrampen und Dechorionierungsschalen hergestellt. Die Injektionsrampen bestehen aus 6 asymmetrischen, 3 mm breiten und 5 cm langen Rinnen, welche durch eine Plastikmatrize in der erstarrenden Agarose erzeugt werden. Die Dechorionierungsschalen sind 4 cm Petrischalen, deren Böden mit Agarose bedeckt sind, damit die dechorionierten Embryonen nicht an der Plastikschaale haften bleiben.

Die Injektionsnadeln werden aus Glaskapillaren mit Hilfe des PC-10 in einem 2-Schritt-Programm gezogen, wobei Schritt 1 bei 67,0 °C und Schritt 2 bei 70 °C durchgeführt wird. Vor Gebrauch müssen die Injektionsnadeln mit Hilfe eines Rasiermessers geöffnet werden.

Da die Embryonen im 1-4-Zellstadium injiziert werden müssen, werden die Fische mit Trennwänden verpaart. Die Eier werden spätestens 30 min nach dem Entfernen der Trennwände in E3 gesammelt und dechorioniert. Dazu werden sie in Dechorionierungsschalen überführt, mit 1 mL Pronase versetzt und so lange geschwenkt, bis sich der erste Embryo aus dem Chorion löst. Dann werden alle Embryonen in eine Glasschale mit E3 überführt und unter Schwenken so lange mit E3 gewaschen, bis ein Großteil der Embryonen das Chorion verlassen hat.

Diese werden anschließend in mit 30 % Danieau's Puffer gefüllten Injektionsrampen aufgereiht und mit Hilfe des Femtojet injiziert. Die typischen Injektioneinstellungen sind: Injektionsdruck 400 hPa, Injektionsdauer 0,1 s, Kapillardruck 3 hPa. Die Injektion erfolgt in den Dotterstrom bzw. direkt in die Zellen, wobei das injizierte Volumen maximal $\frac{1}{4}$ des Dottersackvolumens betragen darf. Die injizierten Eier werden in eine mit E3 gefüllte Glasschale übertragen und 6 h bei 28,5 °C inkubiert. Danach werden die noch lebenden Embryonen in eine neue Glasschale mit E3 und einem Streptomycin/Kanamycin-Gemisch überführt und über Nacht bei 28,5 °C bebrütet. Am nächsten Morgen werden die noch lebenden Embryonen in neue Petrischalen mit E3-Puffer mit Methylblau und PTU überführt.

4.2.1.5 Mikroangiographie

Zur Gefäßdarstellung durch Mikroangiographie werden TRITC- oder FITC-markierte Latexkügelchen (0,02-0,04 µm) 1:1 mit 2 % BSA gemischt, im Ultraschallbad bei maximaler Leistung getrennt und sedimentiert. Die dechorionierten Embryonen werden mit MESAB anästhesiert, mit einer Ölpumpe auf dem Rücken liegend am Dottersack fixiert und eine geringe Menge suspendierter Latexkügelchen vor den *Sinus venosus* oder direkt ins Herz injiziert. Über das Herz werden die markierten Latexkügelchen durch das vaskuläre System transportiert, wobei die unpolaren Latexkügelchen kurzzeitig an den Gefäßwänden haften bleiben [33]. Die Darstellung der Blutgefäße erfolgt anschließend mittels einer Fluoreszenzkamera.

4.2.1.6 Behandlung von Zebrafischembryonen mit verschiedenen Inhibitoren

Je 5 Embryonen des gewünschten Entwicklungsstadiums werden in 24-Loch-Zellkulturschalen mit E3 überführt. Anschließend wird das E3 durch E3 mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren ersetzt. Das Herzkreislaufsystem der Embryonen wird dann je nach Inhibitor auf akute oder längerfristige Effekte hin untersucht.

4.2.1.7 Behandlung von neonatalen Kardiomyozyten mit SU5402

Nach Präparation der neonatalen Kardiomyozyten werden diese in DMEMc-Medium in 12-Loch-Zellkulturschalen ausplattiert. Zur Untersuchung des Einflusses von SU5402 werden kontrahierende Kardiomyozytengruppen vor, während und bis zu 3 h nach Zugabe verschiedener Inhibitorkonzentration in DMEMc unter 60facher Vergrößerung beobachtet und gefilmt.

4.2.1.8 Bestimmung der Kardiomyozytenzahl

Zur Bestimmung der Kardiomyozytenzahl werden je 10 Embryonen in JB4 eingebettet und in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Anschließend werden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, wodurch die Zellkerne dunkelblau gefärbt werden. Danach werden Serienaufnahmen der einzelnen Herzen angefertigt und die Zellkerne des atrialen und ventrikulären Myokards am Bildschirm ausgezählt.

4.2.2 Histologische Methoden

4.2.2.1 Einbettung von Embryonen in JB4

Für histologische Analysen werden die Embryonen in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C oder für 2-3 h bei RT fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe in 100 % Ethanol überführt, in welchem die Embryonen über mehrere Monate bei – 20 °C gelagert werden können. Danach werden die Embryonen 12 h bei 4 °C in frisch hergestellter Infiltrationslösung inkubiert, welche dabei mehrmals gewechselt wird. Zur Einbettung werden 1,5 mL Infiltrating-Solution mit 60 µl JB4-Lösung B vermischt und zusammen mit den Embryonen in eine Einbettungsform gegeben, in welcher die Embryonen dann mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet werden (auf

dem Kopf stehend für Transversal- und auf der Seite liegend für Sagittalschnitte). Nach etwa 10 min beginnt die Lösung zu erstarren. Die Blöcke werden nach einem Tag aus der Form gelöst und für weitere 2-3 Tage ausgehärtet.

Werden immunologisch gefärbte Embryonen eingebettet, muss die Prozedur auf max. 3 h Dauer reduziert werden, wobei die Ethanolreihe und die Inkubation in Infiltrating-Solution verkürzt werden.

4.2.2.2 Einbettung von Zebrafischembryonen und adulten Zebrafischherzen in Paraffin

Zur Einbettung in Paraffin werden die Embryonen über Nacht bei RT in 4 % PFA/0,1 M Phosphatpuffer fixiert. Danach werden die Präparate 2x 10 min und 3x 30 min in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und jeweils 1 h in 70, 90 und 96% Ethanol und 3x 30 min in 100 % Ethanol entwässert. Dann werden die Präparate 3x 30 min in Rotihistol inkubiert und nach jeweils 12 h in Rotihistol/Paraffin 2:1, 1:1 und 1:2 bei 58 °C in Paraffin überführt. Nach 3x 24 h Inkubation in Paraffin bei 58°C werden die Präparate in einer Einbettform ausgerichtet und eingebettet.

4.2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Blöcke mit den in JB4 eingebetteten Embryonen werden mit dem Mikrotom RM 2145 von Leica je nach Anwendung in 4–15 µm dicke Scheiben geschnitten, welche auf unbehandelte Objektträger aufgezogen werden. Die Färbung erfolgt durch 10 min Inkubation in Hämatoxylin und Eosin, jeweils gefolgt von einem Waschschrift von 10 min mit fließendem Wasser.

4.2.2.4 Siriusrot-Färbung

Die Siriusrot-Knorpelfärbung ist bei embryonalen Zebrafischherzen nicht anwendbar. Die in Paraffin eingebetteten adulten Zebrafischherzen werden mit Hilfe des Mikrotoms HM340 E von Microm in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf mit Eiweißglycerin beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach Deparaffinierung (2x 10 min Rotihistol) und Rehydrierung (je 5 min 100, 96, 90 und 70 % Ethanol) werden die Schnitte 1 h in 0,1 % Siriusrot (in gesättigter Pikrinsäure) inkubiert. Danach

werden die Schnitte 2x in 30 % Essigsäure gewaschen, dehydratisiert (je 2 min 75, 90, 96 und 100 % Ethanol) und mit Entellan eingedeckelt.

4.2.3 Immunologische Methoden

4.2.3.1 *In Situ*-Hybridisierung

Die PFA-fixierten und in Methanol gelagerten Embryonen werden bei RT in einer absteigenden Methanolreihe (75 % MeOH/25 % PBT, 50% MeOH/50 % PBT, 25 % MeOH/75 % PBT) je 5 Minuten rehydriert und anschließend 4x für 5 min in PBT gewaschen. Embryonen ab dem 24 hpf-Stadium werden jetzt mit 10 µg/ml Proteinase K bei RT für 20 min (24 hpf), 30 min (36 hpf), 40 min (48 hpf) bzw. 50 min (72 hpf) verdaut. Embryonen älterer Entwicklungsstadien werden mit entsprechend höheren Proteinase K-Konzentrationen verdaut. Danach werden die Embryonen 2x mit PBT gewaschen, 20 min mit 4 % PFA refixiert und nochmals 2x mit PBT gewaschen. Zur Prähybridisierung der Embryonen, d.h. zur Absättigung der unspezifischen DNA- und RNA-Bindestellen, werden diese anschließend in Hybridisierungspuffer bei 70 °C für 4-5 h inkubiert. Danach werden die Embryonen in Hybridisierungspuffer mit der RNA-Sonde über Nacht bei 70 °C inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Sonden zur Wiederverwendung gesammelt und die Embryonen bei 70 °C für je 10 min mit 75 % Hybridisierungspuffer/25 % 2x SSC, 50 % Hybridisierungspuffer/50 % 2x SSC, 25 % Hybridisierungspuffer/75 % 2x SSC, 100 % 2x SSC gewaschen. Danach werden die Embryonen 2x 30 min bei 70 °C mit 0,2x SSC gewaschen. Dann werden die Embryonen bei RT für 5 min mit 75 % 0,2x SSC/25 % PBT, 50 % 0,2x SSC/50 % PBT, 25 % 0,2x SSC/75 % PBT und 100 % PBT gewaschen und 2 h mit Blockingbuffer 1 inkubiert, wobei unspezifische Antikörperbindestellen abgedeckt werden. Die Antikörperreaktion mit 1:2000 in Blockingbuffer 1 verdünnten Alkalische Phosphatase-konjugierten, anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten erfolgt bei 4 °C über Nacht.

Am nächsten Tag werden die Embryonen bei RT 4x kurz und 4x für je 30 min mit 2 mg/ml BSA in PBT gewaschen. Anschließend werden die Embryonen 3x für 5 min in frisch hergestelltem NTMT-Puffer äquilibriert und in 24-Loch-Zellkulturschalen überführt. Die Färbereaktion erfolgt bei RT mit 20 µL NBT/BCIP-Lösung/mL NTMT im Dunkeln unter leichtem Schütteln und muss in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden. Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgt durch

mehrmaliges Waschen mit PBT. Der Dotter kann durch Waschen der Embryonen mit 100 % Ethanol aufgeklärt werden, wodurch eine erheblich bessere Dokumentation ermöglicht werden, ein schwaches Signal aber auch verloren gehen kann.

4.2.3.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Für Doppelimmunfärbungen werden die Embryonen bei RT 12 h in Dent's Fix fixiert und 24 h mit Dent's Bleach gebleicht. Die gebleichten Embryonen werden in 100 % Methanol überführt und können so bei -20°C gelagert werden. Die so fixierten Embryonen werden erst in einer absteigenden Methanolreihe (75 % MeOH/25 % PBT, 50 % MeOH/50 % PBT, 25 % MeOH/75 % PBT und 100 % PBT) je 5 min rehydriert und anschließend 3x mit PBDT gewaschen. Danach wird bei 4°C 90 min mit Blockingbuffer 2 geblockt und über Nacht mit dem ersten primären Antikörper in Blockingbuffer 3 inkubiert (1:50-1:200).

Am nächsten Tag werden die Embryonen bei 4°C 4x 30 min mit Blockingbuffer 3 gewaschen und über Nacht mit dem zweiten primären Antikörper in Blockingbuffer 3 inkubiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen erneut bei 4°C 4x 30 min mit Blockingbuffer 3 gewaschen und anschließend bei RT 3 h mit dem ersten sekundären Antikörper in Blockingbuffer 3 inkubiert (1:100). Danach werden die Embryonen erneut 4x 30 min mit Blockingbuffer 3 gewaschen und 3 h mit dem zweiten sekundären Antikörper inkubiert. Die Embryonen werden 3x 2 min in PBSBT gewaschen und bei 4°C gelagert.

4.2.3.3 Detektion apoptotischer Zellen

Die Markierung von apoptotischen Zellen in Zebrafischembryonen erfolgte nach dem TUNEL Prinzip (*Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*), bei welchem DNA-Doppelstrangbrüche über freie OH-Gruppen nachgewiesen werden. Dazu werden PFA-fixierte Embryonen wie für *in situ*-Hybridisierungen rehydriert, verdaut, refixiert und in PBT gewaschen. Danach werden die Embryonen 5 min mit -20°C kaltem Ethanol/Essigsäure-Gemisch (2:1) inkubiert und 2x in PBS gewaschen. Die Embryonen werden 5 min mit 3 % H_2O_2 inkubiert, 2x mit PBS gewaschen, 1 h in 100 μL Equilibrationbuffer und über Nacht bei 37°C mit 70 % Reaktionspuffer/30 % TdT-Enzyme inkubiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen 10 min in 3 % Waschpuffer inkubiert, 3x mit PBS gewaschen

und 1 h in Blockingbuffer 1 inkubiert. Das übrige Protokoll entspricht dem der *in situ*-Hybridisierung mit der Einschränkung, dass die Färbereaktion nach wenigen Minuten abgeschlossen ist und abgestoppt werden muss, da sonst alle Zellkerne unspezifisch gefärbt werden.

4.2.3.4 Antibiotika und Selektionsplatten

Es werden Stammlösungen der Antibiotika Ampicillin (50 mg/ml), Chloramphenicol (50 mg/mL) und Kanamycin (30 mg/ml) angesetzt, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Der Zusatz der Antibiotika zu den autoklavierten Medien (LB, LB-Broth, AHC, AHC-Agar) erfolgt nach Abkühlung auf etwa 55 °C im Verhältnis 1:1000. Zur Herstellung von selektiven Platten mit Blau-Weiss-Selektion wird dem abgekühlten LB-Agar neben Ampicillin 1 mM IPTG (Stammlösung 100 mM in H₂O) und 0,0004 % X-Gal (Stammlösung 2 % in DMF) zugegeben, gemischt und steril in Petrischalen gegossen. Die Platten werden bei 4 °C gelagert.

4.2.4 Molekularbiologische Methoden

4.2.4.1 Nukleotidaufreinigungsmethoden

4.2.4.1.1 DNA-Isolation aus Zebrafisch-Embryonen

Die DNA-Isolierung aus Zebrafisch-Embryonen und Zebrafisch-Flossen zu Genotypisierungszwecken erfolgt durch Lyse der Gewebe. Dazu werden die Embryonen/Flossen in einer 96-Loch-PCR-Platte einzeln ausplattiert, mit Methanol versetzt und 4 h bei -80 °C inkubiert. Anschließend wird das Methanol bei 50 °C abgedampft. Die Embryonen werden dann in 50 µL und Flossen in 200 µL Lysepuffer mit 1 mg/mL Proteinase K für 12 h bei 50 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K durch Inkubation für 10 min bei 98 °C wird das Lysat 1:25 verdünnt und kann dann für PCR-Analysen eingesetzt werden.

4.2.4.1.2 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation werden ca. 50 Zebrafischembryonen benötigt, die nach Entfernung des Mediums in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert werden. Nach Zugabe von 1 mL Trizol werden die Embryonen durch mehrmaliges kanülieren mit einer Einwegspritze homogenisiert. Danach werden 200 µL Chloroform zugegeben und die Phasen für 15 s kräftig vermischt. Die

Mischung wird für 2-3 min bei RT inkubiert und dann für 15 min in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die farblose wässrige Phase wird vorsichtig in ein frisches Gefäß überführt und mit 500 µL Isopropanol vermischt. Der Ansatz wird für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 13.000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 1 mL 75 % Ethanol gewaschen. Das Sediment wird für 20 min getrocknet, in 50 µL ddH₂O aufgenommen und 5 min bei 50 °C gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der RNA wird diese bei –80 °C gelagert.

4.2.4.1.3 Plasmid-Isolation aus *E.coli*

Die Isolation von Plasmiden aus *E.coli* erfolgt mit den „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) und dem „Ultraprep Kit“ (Molzym) nach den Angaben der Hersteller und basiert auf der Bindung von DNA an Silikatoberflächen unter chaotropen Pufferbedingungen. Die Elution erfolgte je nach Anwendung in 50 µL oder 100 µL ddH₂O.

4.2.4.1.4 Plasmid-Isolation aus *E.coli* zur Injektion

Die Plasmid-Isolation aus *E.coli* zu Injektionszwecken erfolgt mit dem „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ nach Herstellerangaben.

4.2.4.1.5 BAC-DNA-Isolation

Zur Isolation von BAC-DNA aus *E.coli* werden 2x 1,5 mL einer Übernachtskultur sedimentiert und das Sediment in 300 µL P1 (Qiagen) suspendiert. Dazu werden nacheinander 300 µL P2 (Qiagen) und N3 (Qiagen) gegeben und die Mischung vorsichtig vermischt. Das Gemisch wird anschließend 15 min sedimentiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µL Isopropanol versetzt. Nach Sedimentation der DNA für 20 min bei 4 °C wird das Pellet mit 500 µL 70 °C Ethanol gewaschen, 10 min getrocknet und in 50 µL ddH₂O eluiert.

4.2.4.1.6 BAC-DNA-Isolation zur Injektion

Isolierte BAC-DNA wird hier nochmals durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Dazu wird die DNA in 150 µL aufgenommen, mit demselben Volumen Phenol/Chloroform versetzt und 30 s gevortext. Anschließend werden die Phasen durch 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm getrennt, die obere wässrige Phase

abgenommen, mit dem selben Volumen Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird dann 1x mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µL ddH₂O eluiert.

4.2.4.1.7 Gelextraktion

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgt nach dem Ausschneiden der Fragmente aus dem Agarosegel mit Hilfe des „Qiaquick gel extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben.

4.2.4.1.8 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionen erfolgt mit dem „Qiaquick nucleotide removal Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben.

4.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Anhand der Extinktion wird die Konzentration der DNA mit einem Spektralphotometer (LKB Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Es wird eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Nach Eichung des Photometers mit H₂O wird die in H₂O gelöste DNA bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm 47,5 µg/mL doppelsträngiger DNA, 40 µg/mL einzelsträngiger DNA/RNA und etwa 30 µg/mL einzelsträngiger Oligonukleotide. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über mögliche Verunreinigungen mit Proteinen, wobei die Zielwerte zwischen 1,5 und 2 liegen sollten.

4.2.4.3 YAC-End-Isolation

Zur YAC-End-Isolation werden 2 Einzelkolonien in 25 mL AHC-Medium 2-3 d bei 30 °C geschüttelt, 5 min bei 2500 rpm sedimentiert, das Pellet in 1 mL SCE-Lösung suspendiert, mit 75 µL Lysozym-Lösung versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird anschließend mit 2 mL 2 %iger LMP-Agarose (50 °C) vermischt und auf 10 Förmchen (plug molds) aufgeteilt, welche danach in 10 mL Proteinase K-Lösung 24 h bei 50 °C verdaut werden. Anschließend werden auf Eis je ein Agarose-Stückchen in 1 mL 1x TE für 15 min und danach in 1 mL *Bam*HI-Puffer bzw. 1 mL

SpeI-Puffer mit 10 µL 100x BSA für 30 min inkubiert. Danach wird je ein Agarose-Stückchen über Nacht bei 37 °C mit 250 µL Restriktionsansatz mit 5 µL *Bam*HI bzw. *SpeI* inkubiert. Am nächsten Tag wird die DNA aus der Agarose isoliert (siehe Gelextraktion), diese in 25 µL TE-Puffer eluiert und davon 21 µL mit 2,5 µL T4-Ligasepuffer und 1,5 µL T4-Ligase über Nacht bei 16 °C ligiert. Nach Transformation in *E.coli* und Ausplattierung auf LB-Amp-Platten werden von je 12 Kolonien Übernachtskulturen hergestellt, die Plasmide isoliert und ein analytischer Verdau mit *Eco*RI und *Bam*HI durchgeführt. Klone mit einem 9,7 kb-Fragment tragen dabei das T3-Plasmid und Klone mit einem 5,1 kb-Fragment tragen das T7-Plasmid.

4.2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Durch die DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq-Pol) werden ausgehend von kurzen flankierenden Oligonukleotiden (Primern) komplementäre Einzelstränge exponentiell amplifiziert. Je näher dabei die Anlagerungstemperatur an der Schmelztemperatur der Primer liegt, desto spezifischer ist die Primerbindung und desto homogener ist das Amplifikat. Während bei der positionellen Klonierung und Genotypisierung weniger stringente PCR-Bedingungen verwendet werden, sind für die Amplifikation aus cDNA oder PCR-Mutagenese homogene Produkte und strengere PCR-Bedingungen unerlässlich. Ein typischer PCR-Ansatz enthält 2 µL DNA/RNA (5 ng/µl), 1,5 µL 10x Puffer, 1 µL dNTP-Mix (2,5 mM), 2x 0,8 µL Primer (5 µM), 0,05 µL Taq-Pol (Taq (Qiagen), pfu-Turbo (Stratagene), Mol-Taq (Molzym)) und 8,85 µL Wasser (DNase-frei). Das typische PCR-Programm beinhaltet eine initiale Denaturierung für 5 min bei 94 °C, 35-50 Zyklen 30 s bei 94 °C, 30 s bei 55-65 °C und 60 s bei 72 °C, wobei durch die Temperatur des zweiten Schrittes die Spezifität und durch die Länge des dritten Schrittes die maximal mögliche Amplifikatlänge reguliert werden kann, da die DNA-Polymerase etwa 20 Nukleotide/s anhängen kann.

4.2.4.5 Real Time-PCR

Bei der *Real Time*-PCR kann die Produktanreicherung während der PCR in Echtzeit visuell verfolgt werden. Dies kann über die Anlagerung und Detektion sequenzspezifischer fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide (Hybridisierungssonden, Hydrolysesonden, Taqman-Sonden, etc.) oder unspezifischer Farbstoffe

(CybrGreen®) an das PCR-Produkt erfolgen. Die Quantifizierung erfolgt dabei über eine Standardkurve und das logarithmische Verhältnis zwischen der Ausgangsmenge der PCR-Matrize zu dem Zyklus, an dem erstmals das spezifische PCR-Produkt detektiert werden kann und den Hintergrund überschreitet. Zur Normalisierung der Quantifizierungsergebnisse werden diese in ein relatives Verhältnis zur 18S-RNA-Menge gesetzt, die proportional zur eingesetzten RNA-Menge ist. Der Lightcycler® (Roche) stellt dabei ein etabliertes System dar, welches sich durch schnelle Temperaturwechselzeiten auszeichnet. Die ideale PCR-Produktlänge für den Lightcycler liegt bei 90-130 bp.

Ein typischer Reaktionsansatz für mRNA-Quantifizierungen mit CybrGreen besteht aus 1 µL Gesamt-RNA (1 ng/µL), 10 µL CybrGreen RT-PCR Master Mix, 2x 1 µL Primer (20 µM), 0,2 µL Quantitect RT-Enzym Mix und 6,8 µL Wasser (RNase-frei). Das typische RT-PCR-Programm beinhaltet einen initialen Reverse Transkriptase-Schritt von 20 min bei 50 °C, einen Aktivierungsschritt von 15 min bei 94 °C und 45 Zyklen von je 15 s bei 94 °C, 57 °C und 72 °C. Eine Schmelzkurve im Anschluss an die PCR gibt Aufschluss über Homogenität des PCR-Produkts. Die Fluoreszenzmessung erfolgt dicht unterhalb der Schmelztemperatur des Produktes, so dass mitamplifizierte Primerdimere, an die CybrGreen® ebenfalls bindet, nicht detektiert werden können.

4.2.4.6 PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese wird nach den Herstellerangaben von Stratagene mit pfu-DNA-Polymerase durchgeführt. Sie beinhaltet eine PCR-Reaktion ausgehend von zwei überlappenden Primern, welche den zu mutagenisierenden Bereich überdecken und die Mutation enthalten, einen *DpnI*-Verdau, bei dem methylierte, also nicht frisch *in vitro* hergestellte DNA fragmentiert wird und eine Transformation in *E.coli*.

4.2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste bei alkalischem pH-Wert können DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe durch ein elektrisches Feld aufgetrennt werden. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle im elektrischen Feld im Wesentlichen von ihrer Größe, der Höhe der angelegten Spannung und der Agarose-Konzentration des Gels ab. Die Auftrennung erfolgt in

Agarose-Gelen, welche 0,3 % Ethidiumbromid enthalten, einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert. Die Konzentration der Agarose in 1x TBE richtet sich umgekehrt proportional nach der erwarteten Fragmentlänge und liegt zwischen 0,5 % (5 kb) und 2,5 % (150 bp). Die anzulegende Spannung richtet sich nach dem Abstand der Elektroden in den mit 0,5x TBE gefüllten Elektrophoresekammern und soll bei 2-5 V/cm liegen.

4.2.4.7 Denaturierende Gelelektrophorese

13 mL zweier PAA-Gießlösungen mit 15 % und 7,5 % Acrylamid werden so in die Mischvorrichtung gegeben, dass beim Gießen die Konzentration des Acrylamid-Gemischs kontinuierlich abnimmt. Dazu werden unter Rühren je 30 µL Ammoniumpersulfat-Lösung und 13 µL TEMED zugegeben. Die Lösungen werden anschließend über eine Schlauchpumpe in die vorbereiteten Gelkammern gegossen, wobei ein kontinuierlicher PAA-Gradient von 13 %-8 % entsteht. Die Gelkammern bestehen aus zwei Glasplatten, von denen eine U-förmig gummiert ist und 50 aufgeklebte Auswölbungen enthält, in welche später die Proben aufgetragen werden. Während diese Platte mit wasserabweisendem Silan behandelt wird, wird auf die andere Platte mit Wasser und einer Gummirolle eine Gelträgerfolie fixiert. Zwischen beide Platten, die mit Klemmen zusammengehalten werden, wird das Acrylamid-Gemisch langsam bis zur Oberkante gegossen. Dabei entstehende Luftblasen werden mechanisch entfernt. Nach 1 h werden die Platten getrennt und das Gel auf der Gelträgerfolie in einer Klarsichtfolie eingepackt bei 4 °C gelagert.

Die PAA-Gele werden mit 0,1 % Triton-X 100 auf 16 °C vorgekühlte Multiphor-Kammern fixiert, wobei der Elektrodenkontakt zu den mit 1x TBE gefüllten Elektrodenkammern mit TBE-getränkten Fließlappen hergestellt wird. Nach einem Vorlauf von 20 min bei 500 V und 50 W werden die PCR-Proben aufgetragen, nachdem sie mit 4 µL Ladepuffer versetzt und für jeweils 5 min auf 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt wurden. Danach wird für 4-5 h eine Spannung von 500 V angelegt.

Die Färbung der DNA erfolgt durch Silberfärbung. Dazu werden die Gele unter Schütteln 30 min in 10 % Trichloressigsäure fixiert, 4x 5 min in Wasser gewaschen und 45 min in 0,1 % Silbernitrat inkubiert. Danach wird mit 1,5 % Natriumkarbonat und 0,2 % Formalin gefärbt, bis alle Banden klar zu erkennen sind. Die Färbereaktion wird mit 7 % Essigsäure abgestoppt. Anschließend werden die Gele in Wasser gewaschen und in 30 % Glycerin gelagert.

4.2.4.8 Reverse Transkription

Es werden pro Ansatz 1-5 µg RNA in 10 µL eingesetzt. Die RNA wird für 5 min auf 68 °C erwärmt, danach auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Dazu werden ein Mastermix aus 1 µL 1:3 verdünnten RNase-Inhibitor, 4 µL 5x RT-Puffer, 1 µL 4 mM dNTP, 1 µL 1,5 µM pd (N₆)-Primer (oder oligo(dT)) und 2 µL 0,1 M DTT und 1 µL Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird der Ansatz für 5 min bei 95 °C erhitzt, sofort auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Die Lagerung der cDNA erfolgt bei -20 °C. Vor jeder Benutzung muss die cDNA für 5 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis gestellt und zentrifugiert werden.

4.2.4.9 Herstellung von *antisense*-RNA-Sonden

Die Herstellung von *antisense*-RNA-Sonden, sog. Hybridisierungssonden für ISH, umfasst die Amplifikation und Klonierung eines mRNA-Fragments des Zielgens, dessen Sequenzierung und Herstellung einer spezifischen *antisense*-RNA aus dem Plasmid. Die mRNA-Fragmente werden so gewählt, dass sie eine möglichst geringe Homologie zu anderen Genen haben, wobei oft auf die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen zurückgegriffen wird.

Nach Amplifikation, Klonierung, Sequenzierung und Orientierung dieser Fragmente im Plasmid werden 5 µg des Plasmids hinter dem Insert in *antisense*-Richtung durch Restriktionsverdau linearisiert. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wird das linearisierte Plasmid mit dem „Qiagen nucleotide removal Kit“ nach Anleitung der Hersteller aufgereinigt und in 23 µL ddH₂O eluiert, wovon 20 µL in der anschließenden *in vitro*-Transkription eingesetzt werden. Je nach Orientierung des Gens im Plasmid und Art des Plasmids werden zur Transkription der *antisense*-RNA die T7-, T3- oder SP6-Polymerase verwendet. Zu 20 µL Plasmid werden dazu 3 µL 10x Transkriptionspuffer, 3 µL Digoxigenin- oder Fluorescein-RNA Labeling Mix (Roche), 1,5 µL RNase-Inhibitor und 2,5 µL der jeweiligen Polymerase zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wird die DNA durch Zugabe von 3 µL DNase I und 15 min Inkubation bei 37 °C degradiert. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 3 µL 0,2 M EDTA, 3,75 µL 4 M LiCl und 112,5 µL Ethanol (-80 °C vorgekühlt) und Inkubation für mindestens 2 h bei -20 °C. Die RNA wird anschließend bei 14.000 rpm und 4 °C 20 min sedimentiert und das Pellet mit 70 % Ethanol

gewaschen. Das Sediment wird 20 min bei RT getrocknet, in 100 µL Hybridisierungspuffer aufgenommen und bei –80 °C gelagert. Die Sonden werden in Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 eingesetzt. Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide oder unspezifischer Produkte kann die Sonde an Embryonen bei 70 °C über Nacht zwei bis dreimal vorinkubiert oder über eine Sepharex-Säule aufgereinigt werden.

4.2.4.10 mRNA-Herstellung durch *in vitro*-Transkription

Die mRNA-Herstellung erfolgt mit Hilfe des „mMessage mMachine Kits“ von Ambion nach Herstellerangaben.

4.2.4.11 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgt nach den Vorgaben der Hersteller der Restriktionsenzyme. Ein typischer Reaktionsansatz beinhaltet 2 µL Plasmid (200 ng/µL), 1,5 mL 10x Puffer, 0,15 µL 100x BSA, 1 µL Restriktionsenzym und 10,35 µL Wasser. Analytische Restriktionen werden für 30 min und präparative Restriktionen für 3 h bei 37 °C inkubiert.

4.2.4.12 Alkalische Dephosphorylierung von Plasmiden

Um die Religation von Plasmiden bei der Ligation zu verhindern, werden die Enden der linearen Plasmide durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Dazu werden 26 µL Plasmid mit 3 µL SAP-Puffer und 1 µL Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die SAP für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

4.2.4.13 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearen Vektoren erfolgt im molekularen Verhältnis von 6 : 1 bei einem Temperaturgradient von 37 °C bis 4 °C. Ein typischer Ligationsansatz besteht aus 1 µL Vektor-DNA, 6 µL Insert-DNA, 1 µL 10x T4-Ligase-Puffer und 2 µL T4-Ligase. Das typische Ligationsprogramm beinhaltet je 1 h 37 °C,

28 °C, 20 °C, 14 °C und 4 °C. Im Anschluss erfolgt die direkte Transformation in *E.coli*.

4.2.4.14 Transformation von *E.coli*

Die Transformation in „chemisch kompetente“ TOP10-Zellen (Invitrogen) erfolgt nach Herstellerangaben. Für die Transformation in elektrisch kompetente Zellen durch Elektroporation werden zuerst 40 µL kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Danach werden 1-5 µL DNA zu den Zellen gegeben, diese gemischt und 30 s auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen in auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvetten (1 mm) überführt und in der Elektroporationskammer für 0,1 s mit 1,8 kV elektroporiert. Die Zellen werden anschließend in 500 µL SOC-Medium aufgenommen, 1 h bei 37 °C inkubiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

4.2.4.15 Microarray

Mittels eines Microarrays kann in Gewebeproben gleichzeitig die Expression verschiedener Gene relativ quantifiziert werden. Dazu werden auf einer Glasoberfläche komplementäre cDNA-Fragmente definierter Gene aufgetragen. An diese komplementären cDNA-Fragmente können aus mRNA hergestellte und fluoresezenzmarkierte cDNAs verschiedener Gewebeproben binden. Werden die zu vergleichenden mRNA-Proben mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, können diese gemischt und gemeinsam auf einem Mikroarray hybridisiert werden. Abhängig davon, wie stark in der einen oder der anderen mRNA-Probe ein bestimmtes Gen exprimiert ist, erscheint der „Spot“ in einer Mischfarbe aus beiden Fluoreszenzfarbstoffen, wobei durch das Microarray-Lesegerät die Intensität der Einzelsignale bestimmt wird. Die Unterschiede in den Emissionsintensitäten, die proportional zur Menge spezifischer cDNA ist, werden anhand der Pixeldichte errechnet und als eine Mischfarbe aus grün und rot dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Weiches *herz*^{m245} - Embryonaler Tod durch kontraktile Dysfunktion

Die Zebrafisch-Herzmutante *weiches herz*^{m245} (*whz*) wurde im Rahmen der funktionellen Genomanalyse im ersten großen systematischen Mutagenese-Screen für rezessive embryonale Phänotypen durch ENU-Mutagenese erzeugt [39]. Wie bei 57 weiteren Mutanten dieses Screens zeigen homozygot-mutante *whz*-Embryonen einen Defekt des kardiovaskulären Systems. Aufgrund seiner ventrikulären kontraktilen Dysfunktion wurde *whz* primär als ventrikuläre Herzfunktionsschwäche charakterisiert [31]. Seinen Namen trägt die *whz*-Mutante aufgrund der „weichen“, wellenförmigen und peristaltischen Kontraktion der *whz*-Herzen, die in ihrer Form und Funktion an noch undifferenzierte Herzen direkt nach der kardialen Fusion erinnern, die eine schwache Blutzirkulation durch unidirektionale Kontraktionswellen innerhalb des Herzschlauchs erzeugen.

Ab 24 Stunden nach der Befruchtung (*hours post fertilization*, hpf) entwickeln phänotypisch mutante *whz*-Embryonen einen Blutstau im *Sinus venosus* und große Perikardödeme. Darüber hinaus zeigen mutante *whz*-Embryonen bis auf die Tatsache, dass sie keine luftgefüllte Schwimmblase ausbilden, keine weiteren offensichtlichen Organdefekte oder Störungen der Skelettmuskulatur. Alle mutanten *whz*-Embryonen sterben, wie andere Zebrafisch-Herzfunktionsmutanten, 7 bis 9 Tage nach der Befruchtung (*days post fertilization*, dpf), wenn die Nährstoffe des Dottersacks aufgebraucht sind und die Versorgung des peripheren Gewebes von einer intakten Blutzirkulation abhängig wird.

5.2 Charakterisierung von *weiches herz*^{m245}

5.2.1 Ventrikuläre Dysfunktion in *weiches herz*^{m245}

Das Herz mutanter *whz*-Embryonen 48 hpf ähnelt in seiner Form und Funktion dem frühembryonalen Herzschlauch eines Wildtyp(WT)-Embryos direkt nach der kardialen Fusion 24 hpf. Wie dort durchlaufen langsame Kontraktionswellen die *whz*-Herzen ausgehend vom *inflow tract* (IFT). Um zu untersuchen, ob sich die *whz*-Herzen nach der kardialen Fusion weiterentwickeln oder in diesem Entwicklungsstadium

persistieren, wird die Herzfrequenz von WT- und mutanten *whz*-Embryonen über den Zeitraum von 24-72 hpf bestimmt.

Wie WT-Embryonen steigern phänotypisch mutante *whz*-Embryonen ihre Herzfrequenz im Verlauf der Embryonalentwicklung, was zeigt, dass sich die Herzen trotz ihrer seit der kardialen Fusion unveränderten Morphologie und Funktion funktionell weiterentwickeln (Abb. 6).

Um zu untersuchen, in welchem kardialen Entwicklungsstadium die kontraktile Dysfunktion in mutanten *whz*-Embryonen auftritt, wird 36-72 hpf das *fractional shortening* als Maß für die Kontraktionsstärke von Atrium und Ventrikel bestimmt. Während die atriale Kontraktionsstärke von *whz*-Herzen zwischen 48 und 72 hpf im Vergleich zu WT-Atria leicht erhöht ist (Abb. 6), kann die ventrikuläre Kontraktilität nicht bestimmt werden. Der Grund hierfür liegt in der peristaltischen Kontraktion der *whz*-Herzschläuche. Dadurch werden die in phänotypisch mutanten *whz*-Embryonen zu kleinen Ventrikel während der normalen atrialen Systole durch zu viel Blut aufgebläht wird und versuchen gleichzeitig, das Blut durch einen partiell obstruierten Ausflusstrakt zu pumpen. Die Folge ist eine langsame Erschlaffung des Ventrikels während der atrialen Diastole, wobei sich das ventrikuläre Blut sowohl in die Aorta, als auch in das Atrium entleert, und die progressive Dilatation des Ventrikels.

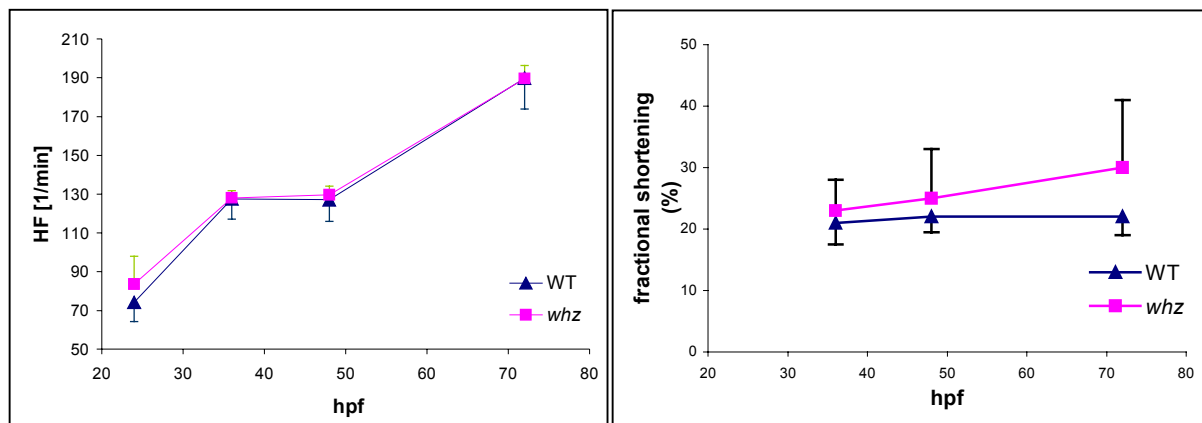


Abb. 6 Darstellung von Herzfrequenz und atrialem *fractional shortening* von WT- (n=12) und mutanten *whz*-Embryonen (n=12). Dargestellt sind MW \pm SD.

Das Verhältnis aus größtem (im WT Diastole) und kleinstem Kammerdurchmesser (im WT Systole), aus welchem sich das *fractional shortening* berechnet, kann demnach hier nicht zur Berechnung der ventrikulären Kontraktionsstärke herangezogen werden.

Insbesondere ab 72 hpf zeigen *whz*-Ventrikel keine erkennbaren Kontraktionen mehr.

5.2.2 Unauffällige ventrikuläre Myofilamentstruktur in *weiches herz*^{m245}

Um weiter die ventrikuläre Dysfunktion in *whz* zu untersuchen, wird die ultrastrukturelle sarkomerische Organisation ventrikulärer *whz*-Kardiomyozyten mittels Elektronenmikroskopie analysiert.

Da dabei die gleiche Organisation der sarkomerischen Strukturen in WT- und mutanten *whz*-Embryonen festgestellt wird (Abb. 7), kann eine fehlerhafte Assemblierung der ventrikulären Sarkomere als Ursache für die ventrikuläre kontraktile Dysfunktion ausgeschlossen werden.

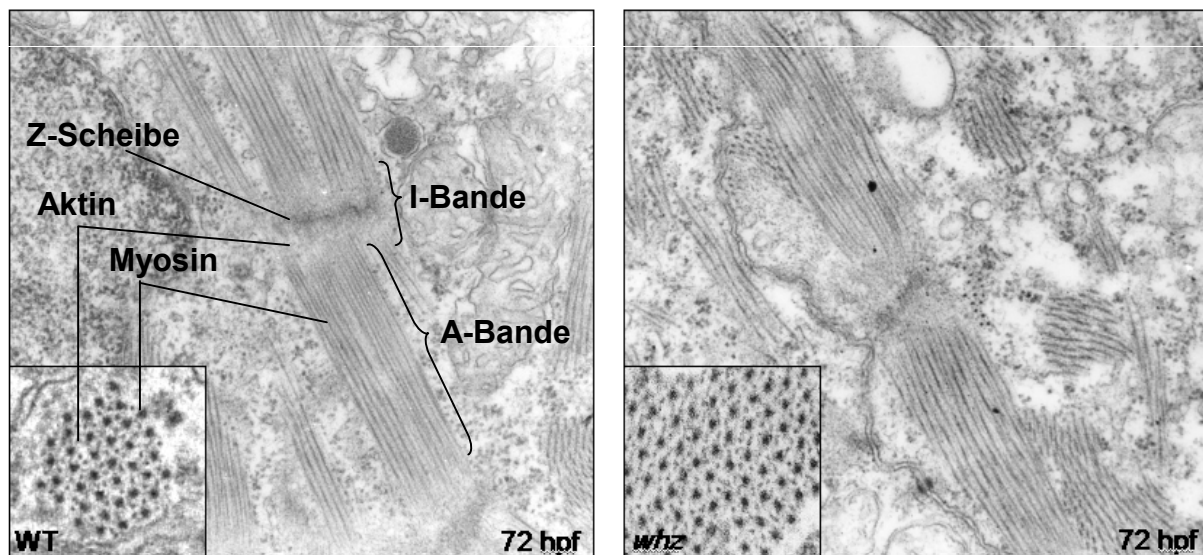


Abb. 7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT(A)- und mutanten *whz*- Kardiomyozyten (B). Wie im WT sind die Aktinfasern in *whz* hexagonal um die Myosinfasern angeordnet (Querschnitt). Z-Scheiben, A- und I-Bänder sind ebenfalls unauffällig.

Da die Sarkomerstruktur ventrikulärer *whz*-Kardiomyozyten unauffällig ist, wird die transkardiale Verteilung der Sarkomere zu funktionellen Myofilamenten untersucht. Dazu werden in WT- und mutanten *whz*-Embryonen die Z-Scheiben durch einen Antikörper gegen Nexilin und das A-Band durch einem Antikörper gegen Myosin fluoreszenzmarkiert und konfokal-lasermikroskopisch untersucht.

Wie bei WT-Embryonen wird in den Ventrikeln mutanter *whz*-Embryonen eine lückenlose Verteilung von Sarkomeren zu Myofilamenten festgestellt (Abb. 8), so dass hier ebenfalls nicht die Ursache für die ventrikuläre kontraktile Dysfunktion zu finden ist. Eine Ursache für die verringerte Kontraktilität könnte jedoch sein, dass in *whz*-Ventrikeln relativ zu Nexilin deutlich weniger Myosin exprimiert wird als in WT-

Embryonen, wie an der relativen Verteilung von rot zu grün zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu scheinen die *whz*-Atria die verringerte Kontraktilität teilweise durch eine verstärkte Expression von Myosin zu kompensieren, was sich auch in leicht erhöhten *fractional shortening*-Werten widerspiegelt.

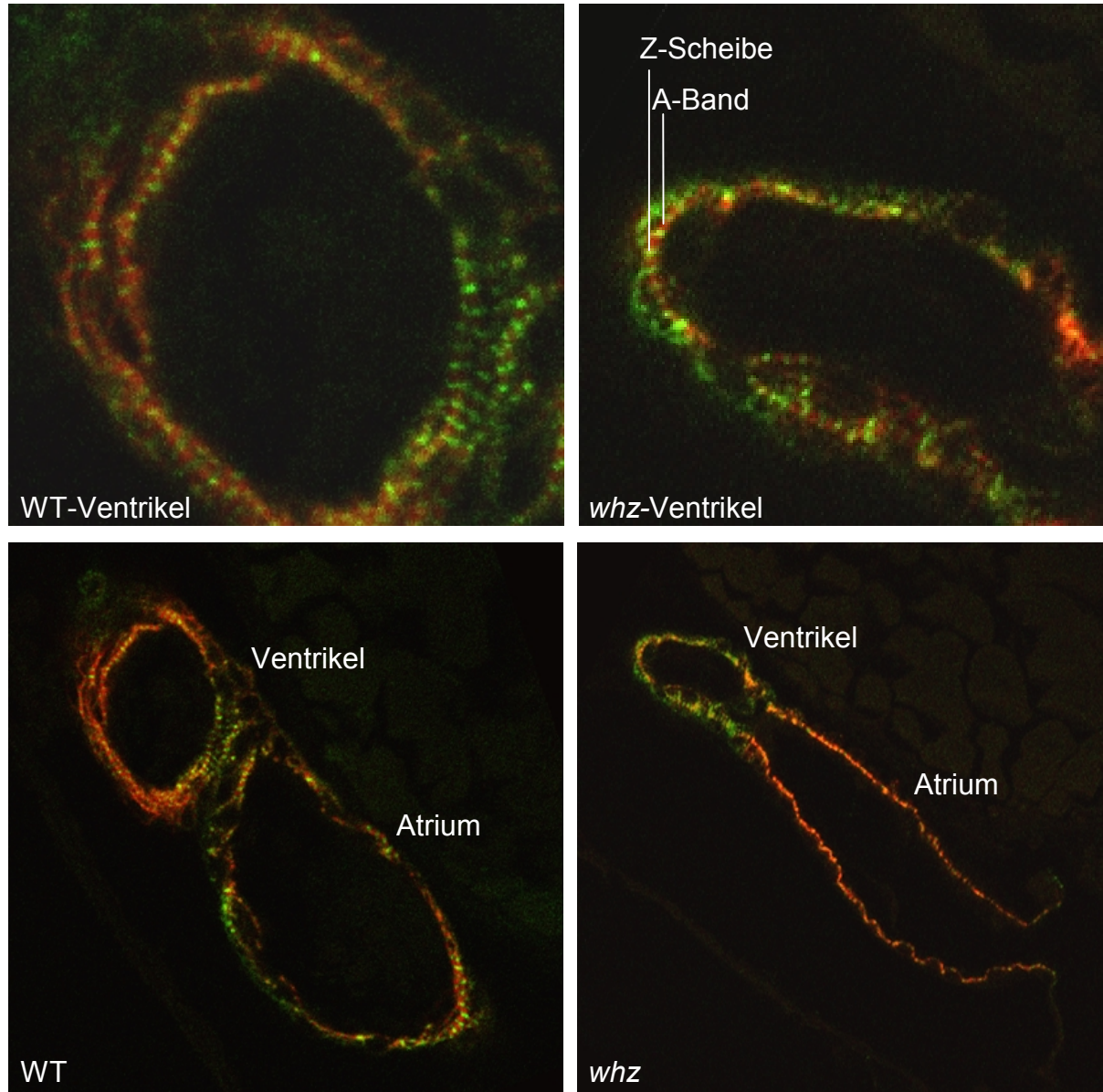


Abb. 7 Konfokal-mikroskopische Aufnahme von WT- und *whz*-Herzen 48 hpf mit fluoreszenzmarkierten Z-Scheiben (grün) und A-Banden (rot). In WT- und *whz*-Herzen sind die Sarkomere zu transkardialen Myofilamenten organisiert. Das Verhältnis von Myosin zu Nexilin ist in *whz*-Ventrikeln deutlich kleiner und in *whz*-Atria deutlich größer als in WT-Herzen.

Zusätzlich zu Atrium und Ventrikel beginnt in mutanten *whz*-Embryonen der Ausflusstrakt (*Bulbus arteriosus*), 4-5 dpf eine dritte Herzkammer zu bilden und zu kontrahieren. Durch die fehlende Expression kardial-spezifischer kontraktiler Proteine, hier *cmlc2* (Abb. 8), wird gezeigt, dass diese zusätzlichen Herzkammer nicht-kardialen Ursprungs ist.

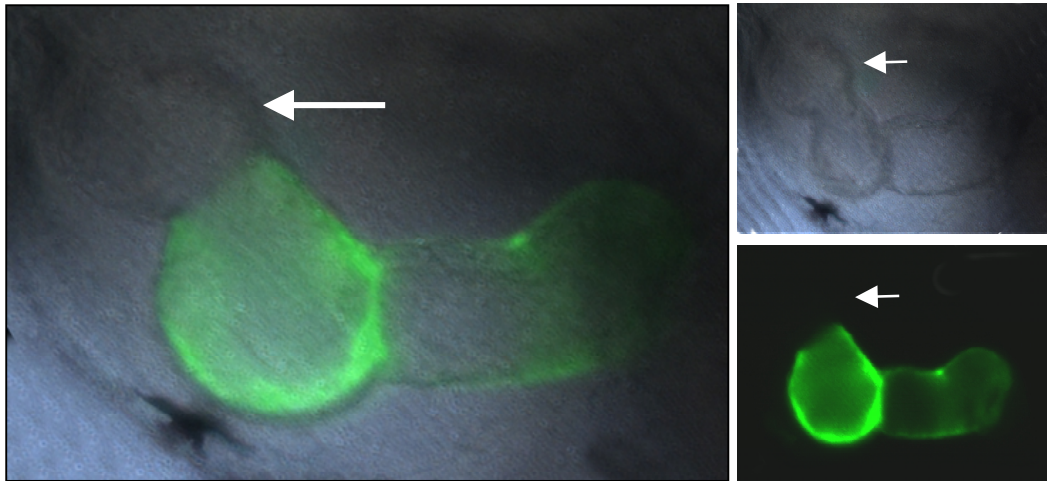


Abb. 8 Ausgeprägter und stark kontrahierender *Bulbus arteriosus* in mutanten *whz*-Embryonen. Die fehlende *cmlc2*-Expression zeigt den nicht-kardialen Ursprung der zusätzlichen Herzkammer (Pfeil).

5.3 Untersuchung der Herzmorphologie von *weiches herz*^{m245}

5.3.1 Defekte Herzmorphologie in *weiches herz*^{m245}

Mutante *whz*-Embryonen sind bis 24 hpf von ihren phänotypisch normalen Geschwistern nicht unterscheidbar. Während in der weiteren Entwicklung bis 48 hpf der Herzschlauch von WT-Embryonen in zwei sequentiell kontrahierende Herzkammern differenziert, die durch den atrioventrikulären Kanal (AVC) getrennt sind, scheinen die Herzen von mutanten *whz*-Embryonen in ihrer Entwicklung zu persistieren. 48 hpf sind weder eindeutig separierte Herzkammern zu erkennen, noch fand ein Wechsel von peristaltischer zu sequentieller Kontraktion von Atrium und Ventrikel statt, der in ausgereiften gesunden Herzen einen unidirektionalen Blutfluss sicherstellt. Wie in WT-Embryonen migriert der bei der kardialen Fusion gebildete Herzschlauch mutanter *whz*-Embryonen im Laufe seiner Entwicklung von der Mittellinie bis unter den Kopf. Die Herzdrehung, durch welche die spätere Position von Atrium (links) und Ventrikel (rechts) festgelegt wird, findet allerdings nicht statt (Abb. 9). Charakteristisch für *whz*-Herzen sind stark verkleinerte Ventrikel, ein schlauchförmiges und oft vergrößertes und dilatiertes Atrium und die fehlende oder stark reduzierte Einschnürung zwischen Atrium und Ventrikel (Abb. 9). Von 72 hpf an können in mutanten *whz*-Embryonen zwei generelle Herzphänotypen unterschieden werden. Während der größte Teil (85 %) der *whz*-Herzen bis 72 hpf komplett kollabiert, was sehr früh zum Verlust der Blutzirkulation und großen Ödemen führt, sind in den übrigen Herzen besonders Atrium, aber auch Ventrikel dilatiert und

zeigen zusätzliche Einschnürungen, was in der weiteren Entwicklung zur Ausbildung zusätzlicher Herzkammern führt. Bei dieser Gruppe ist oft der *outflow tract* (OFT) stark vergrößert und beginnt, 4-5 dpf synchron zum Ventrikel zu kontrahieren. Diese 3-5-Kammer-Hezen können trotz der peristaltischen Kontraktionen von Atrium und Ventrikel bis zum Tod der Embryonen 9 dpf eine schwache Blutzirkulation aufrechterhalten.

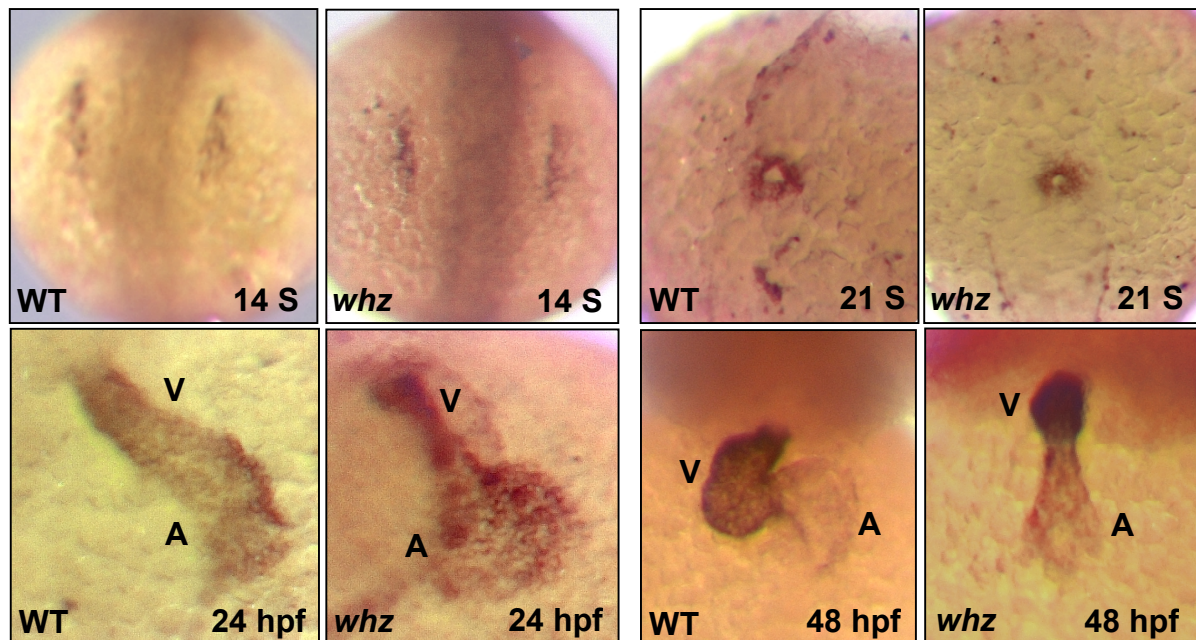


Abb. 9 Darstellung der Herzentwicklung von WT- und *whz*-Embryonen zwischen 14 Somiten-Stadium (S) und 48 hpf durch *in situ*-Hybridisierung gegen die transmyokardial exprimierte *Myosin leichte Kette 2 (mlc2)*. 48 hpf ist in *whz* der Ventrikel (V) verkleinert und durch die stärkere *mlc2*-Expression gut von Atrium (A) unterscheidbar. Besonders 24 hpf ist das vergrößerte Atrium zu erkennen.

5.3.2 Verringerte ventrikuläre Kardiomyozytenproliferation in *weiches herz*^{m245}

Die ventrikuläre Masse ist in mutanten *whz*-Embryonen deutlich geringer als in WT-Embryonen. Um zu differenzieren, ob die Ursache für die verkleinerten Ventrikel in mutanten *whz*-Embryonen in einer verringerten Zellgröße (Hypotrophie) oder einer verringerten Zellzahl (Hypoplasie) liegt, wird die Kardiomyozytenzahl in histologischen Serienschnitten ausgezählt.

Der Vergleich der ventrikulären Kardiomyozytenzahlen ergibt bei den mutanten *whz*-Embryonen eine signifikant geringere Zellzahl (130 ± 29 ($n = 9$) / 358 ± 23 ($n = 4$); $p \leq 0,05$, t-Test), was beweist, dass eine Hypoplasie für die verringerte ventrikuläre Masse verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu stützt die Berechnung der atrialen Kardiomyozytenzahl die Beobachtung, dass die Atria mutanter *whz*-

Embryonen vergrößert sind. Der Vergleich der Kardiomyozytenzahlen ergibt eine leichte, aber signifikant erhöhte atriale Kardiomyozytenzahl in mutanten *whz*-Embryonen (227 ± 50 ($n = 9$) / 153 ± 26 ($n = 4$); $p \leq 0,05$, t-Test).

Um zu unterscheiden, ob die ventrikuläre Hypoplasie durch verringerte Proliferation oder durch verstärkte Apoptose verursacht wird, wird die Zahl apoptotischer kardialer Zellen mittels eines TUNEL-Experiments bestimmt. Der Vergleich von WT- mit mutanten *whz*-Embryonen 36, 48 und 72 hpf ergibt dabei keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen, was zeigt, dass die ventrikuläre Hypoplasie nicht durch vermehrte Apoptose, sondern durch die verringerte Proliferation der Kardiomyozyten verursacht sein muss.

5.3.3 Keine endokardiale AVC-Anlage in *weiches herz*^{m245}

Um die Herzmorphologie in mutanten *whz*-Embryonen zu untersuchen, werden die Herzen histologisch untersucht.

Dies zeigt 72 hpf, dass sich die mutanten *whz*-Herzen wie WT-Herzen aus einer endokardialen und einer myokardialen Zellschicht zusammensetzen. Zusätzlich kann man trotz der fehlenden Einschnürung in der atrioventrikulären (AV-)Region eindeutig zwischen atrialem und ventrikulärem Gewebe unterscheiden, da im Gegensatz zum Atrium im Ventrikel die Herzgallertschicht zwischen Endokard und Myokard durch subendokardiales Gewebe ersetzt und die Myokardschicht dicker ist (Abb. 10). Im Gegensatz zu WT-Herzen, bei denen sich Endokardzellen an der AV-Grenze sammeln, die später im Prozess der endothelial-zu-mesenchymalen Transformation (EMT) in fibröses Gewebe transdifferenzieren (EMT) und die AV-Klappen ausbilden, kann diese Gruppierung von Endokardzellen an der AV-Grenze mutanter *whz*-Herzen nicht beobachtet werden. Dementsprechend zeigen histologische Schnitte von mutanten *whz*-Embryonen 5 dpf an der AV-Grenze keine Herzklappen (Abb. 10).

Darüber hinaus sind 5 dpf verschiedene Stadien intraatrialer Septierungen zu erkennen, die mit einer Schwellung der Herzgallertschicht und Ansammlung von Endokardzellen beginnen und bis zur Septierung durch Proliferation des Myokards gehen (Abb. 10).

Dies zeigt, dass innerhalb des Atriums und nicht an der AV-Grenze ein AVC-spezifisches endo- und myokardiales Differenzierungsprogramm gestartet wird.

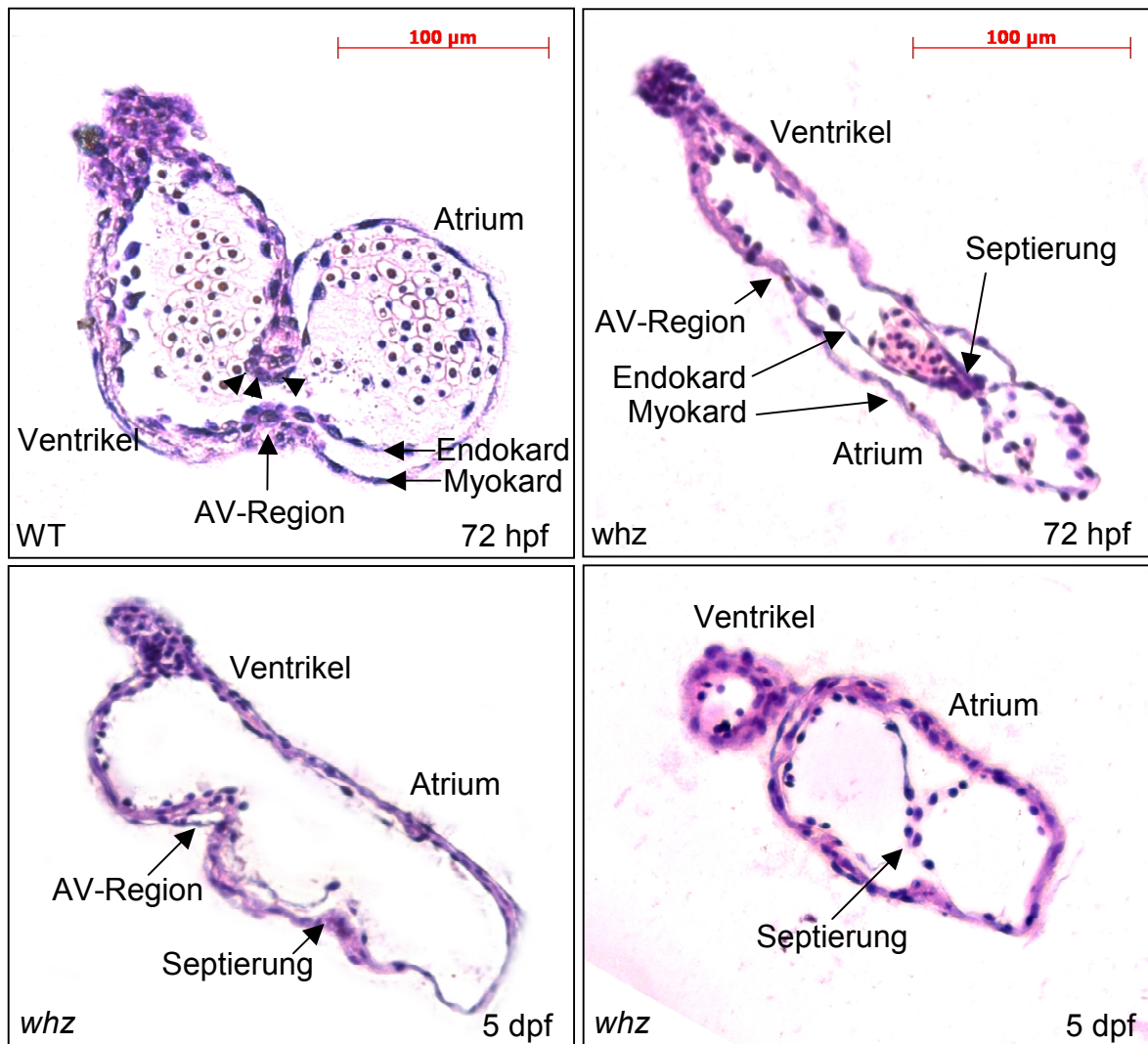


Abb. 10 Histologische Schnitte von WT- und mutanten *whz*-Embryonen 72 hpf und 5 dpf, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. Bei 72 hpf findet bei mutanten *whz*-Embryonen keine Gruppierung von Endokardzellen an der AV-Grenze statt (endokardiale *cushions*, Pfeile). Entsprechend sind bei 5 dpf keine AV-Klappen zu erkennen. Alle *whz*-Herzen zeigen intraatriale Septierungen bzw. myokardiale Einschnürungen.

5.3.4 AV-Klappendefekte in adulten heterozygoten *weiches herz*^{m245}-Fischen

Die Untersuchung der Mendel'schen Verteilung von *whz* ergibt, dass 48 hpf anstatt einem Viertel 31 % der Nachkommen heterozygoter *whz*-Paare ($n \approx 10000$) als phänotypisch mutant sind. Die Genotypisierung dieser Embryonen ergibt, dass 12 % der heterozygoten *whz*-Embryonen einen phänotypisch mutanten *whz*-Phänotyp haben, was der beobachteten Differenz von 6 % entspricht. Während 58 % dieser Embryonen bis 72 hpf normale Herzen entwickeln und bis zum Erwachsenenalter aufgezogen werden können, stirbt der Rest wie die homozygot-mutanten *whz*-Embryonen 7-9 dpf.

Darüber hinaus zeigen 15-25 % **aller** heterozygoten *whz*-Embryonen AV-Überleitungsstörungen, die sich durch AV-Blöcke 2. und 3. Grades auszeichnen.

Bei adulten heterozygoten *whz*-Fischen liegt das Verhältnis von Männchen zu Weibchen bei 10:1. Dazu kommt, dass die heterozygoten *whz*-Männchen im Vergleich zu den Weibchen eine deutlich reduzierte Lebenserwartung haben und oft starke Einblutungen im Thorax zeigen. Da dies wie die pathologischen Phänotypen heterozygoter *whz*-Embryonen auf einen dominanten Phänotyp hinweist, werden histologische Schnitte in Paraffin eingebetteter Herzen adulter WT- und heterozygoter *whz*-Zebrafische angefertigt. Da von einem dominanten Defekt der AV-Region ausgegangen wird, werden die Herzen mit Siriusrot gefärbt, das fibröses Gewebe und damit auch die AV-Klappen, die im WT aus 3 Segeln bestehen, anfärbt (Abb. 11).

Ventrikel, Ausflusstrakte und Aortenklappen der heterozygoten *whz*-Weibchen sind in ihrer Struktur nicht von denen der WT-Fische unterscheidbar. Bei einem von 4 Tieren besteht die AV-Klappe jedoch nicht aus 3, sondern aus 2 Segeln (Abb. 11). Zusätzlich enthalten alle Ventrikel der heterozygoten *whz*-Weibchen eine Vielzahl kleinerer Fibrosierungsfoci, die auf ischämische Ereignisse hindeuten könnten. Die Präparation der Herzen von heterozygoten *whz*-Männchen ist sehr schwierig, da die Herzen der mit MESAB anästhesierten Fische im Gegensatz zu den anderen Fischen nicht mehr kontrahieren und strukturell so instabil sind, dass sie bei der Präparation am AVC zerreißen.

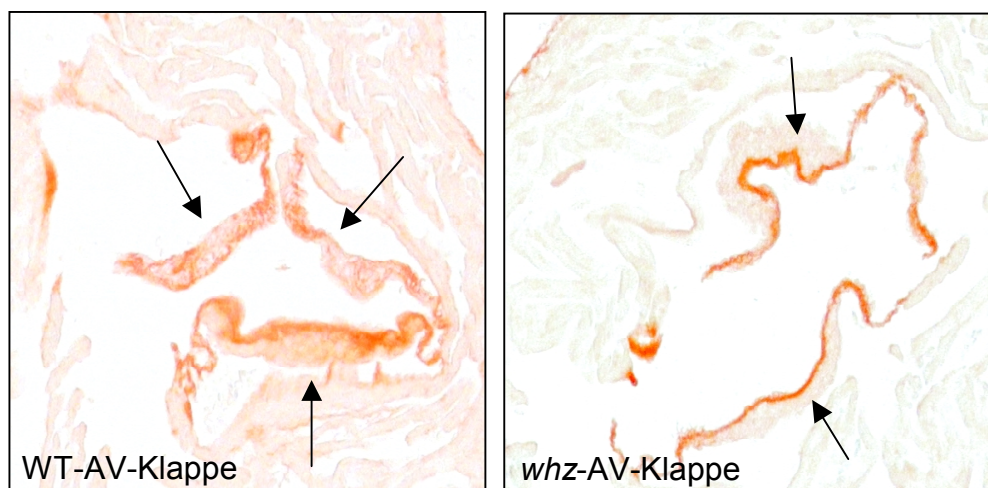


Abb. 11 Histologische Schnitte adulter WT-(links) und heterozygoter *whz*-Weibchen. Durch die Siriusrot-Färbung wird Bindegewebe (u. a. Herzklappen) rot gefärbt. Bei dem dargestellten heterozygoten *whz*-Weibchen besteht die AV-Klappe anstatt aus drei aus nur zwei Segeln (Pfeile).

Die Instabilität der Herzen heterozygoter *whz*-Männchen könnte die Ursache für deren verringerte Lebenserwartung sein. Die fehlerhafte AV-Klappenanlage und geschlechtsspezifische Instabilität der Herzen stellen die abgeschwächte dominante Form des *whz*-Phänotyps dar.

5.3.5 Koexpression kammerspezifischer Gene in der AV-Region von *weiches herz*^{m245}

Um die Differenzierung der morphologisch stark betroffenen mutanten *whz*-Herzen in Atrium und Ventrikel zu untersuchen, wird die Expression herzkammerspezifischer Gene durch *in situ*-Hybridisierungen (ISH) untersucht. Dazu werden RNA-*antisense*-Sonden (*Riboprobes*) gegen die atrial-spezifische *atrial myosin heavy chain* (*amhc*) und gegen die Ventrikel-spezifische *ventricular myosin heavy chain* (*vmhc*) benutzt.

Wie bei WT-Embryonen kann bei mutanten *whz*-Embryonen 48 hpf gezeigt werden, dass *whz*-Herzen aus zwei Herzkammern, einem *amhc*-exprimierenden Atrium und einem *vmhc*-exprimierenden Ventrikel, bestehen (Abb. 13).

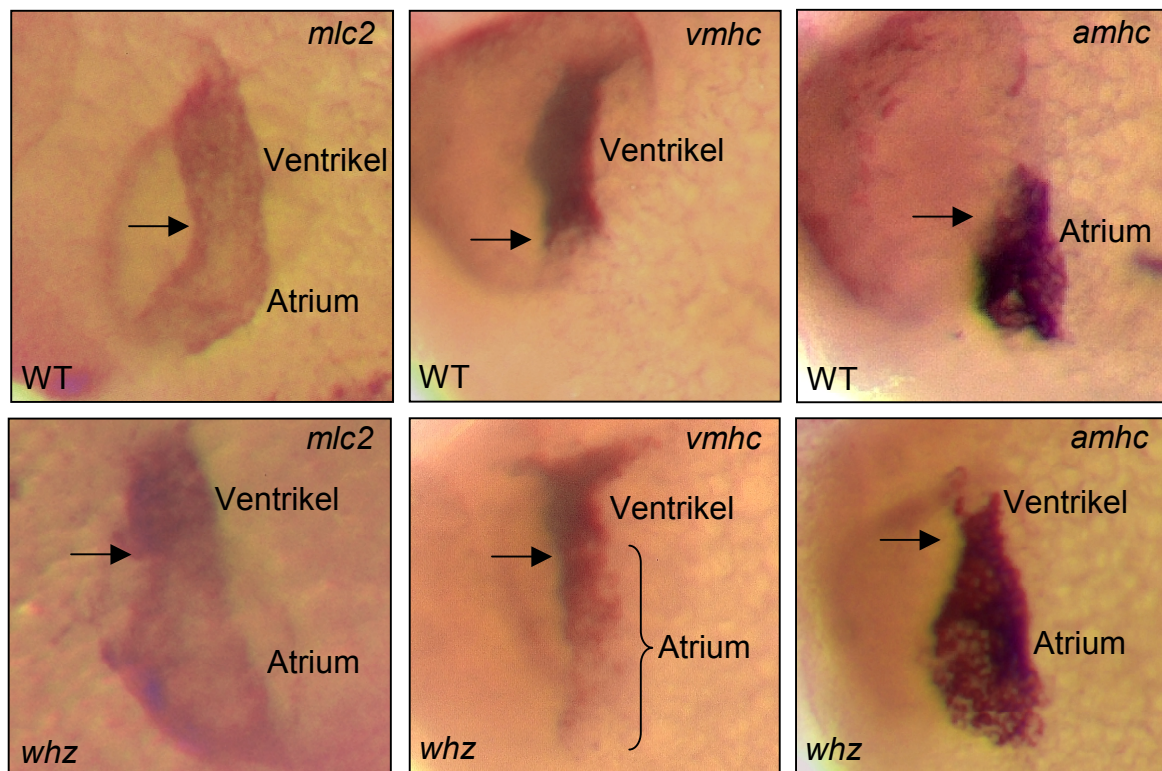


Abb. 12 *In situ*-Hybridisierung zeigt die Expressionsverteilung von *amhc* und *vmhc* in WT- und mutanten *whz*-Embryonen 36 hpf. Im WT stellen *amhc* das Atrium, *vmhc* den Ventrikel und *mhc2* das gesamte Herz dar. In mutanten *whz*-Embryonen sind besonders an der AV-Region (Pfeil) *amhc* und *vmhc* koexprimiert.

Bei genauerer Betrachtung früherer Entwicklungsstadien (24 und 36 hpf) fällt jedoch auf, dass im Gegensatz zum WT in *whz* Teile der atrialen Kardiomyozyten,

besonders an der zukünftigen AV-Region, auch *vmhc* exprimieren und dass *amhc* in ventrikulären Kardiomyozyten nahe der zukünftigen AV-Grenze exprimiert wird (Abb. 12). Erst nach 48 hpf ist in mutanten *whz*-Embryonen die Expression von *vmhc* im Atrium vollständig verschwunden. Die ventrikuläre Expression von *amhc* konzentriert sich jedoch auf einzelne Kardiomyozyten (Abb. 13).

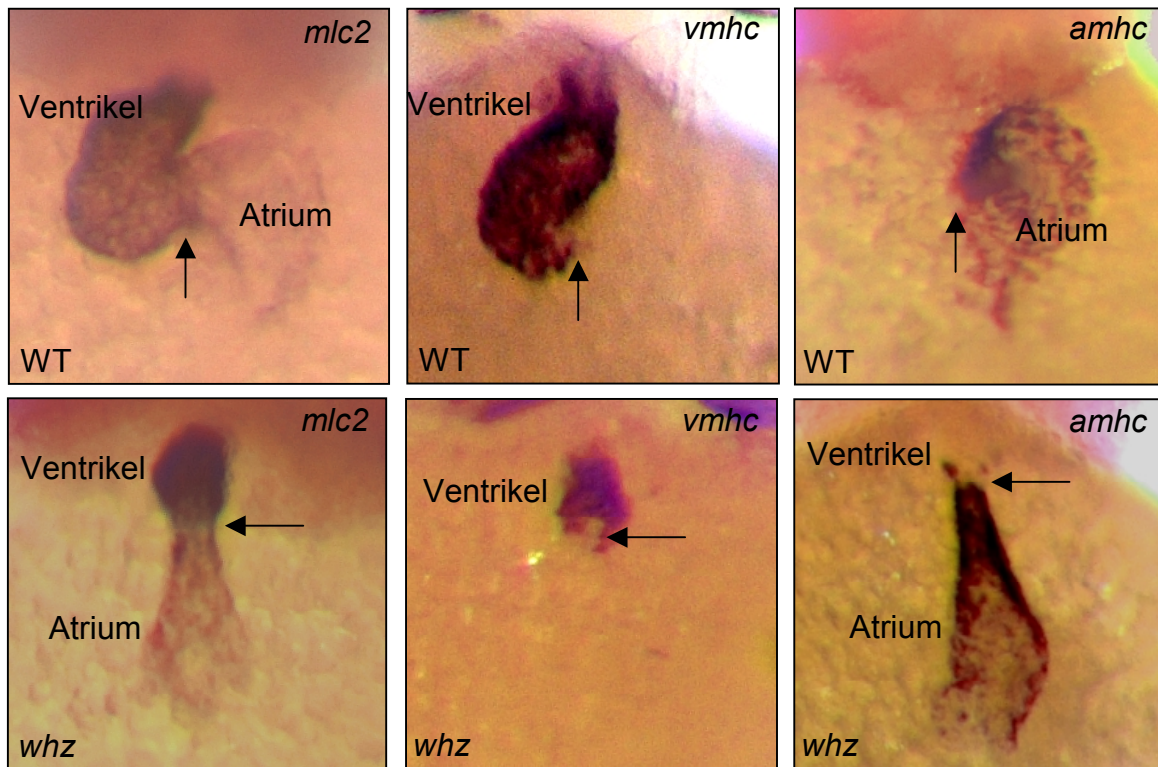


Abb. 13 *In situ*-Hybridisierung zeigt die Expression von *amhc* und *vmhc* bei WT- und mutanten *whz*-Embryonen 48 hpf. Im WT stellen *amhc* das Atrium, *vmhc* den Ventrikel und *mhc2* das gesamte Herz dar. In mutanten *whz*-Embryonen exprimieren nur noch einzelne Kardiomyozyten des Ventrikels atrial-spezifisches *amhc*. Die Pfeile markieren die AV-Region.

Die Expression atrialer Gene in einzelnen Kardiomyozyten des Ventrikels wird auch auf Protein-Ebene untersucht. Dazu werden WT- und mutante *whz*-Embryonen mit einem Antikörper gegen Myosin (MF20) und einem Antikörper gegen atriales Myosin (S46) fluoreszenzmarkiert. Bei allen untersuchten mutanten *whz*-Herzen ab 48 hpf wird dabei in einzelnen Kardiomyozyten des Ventrikels atriales Myosin nachgewiesen, wobei nicht nur Kardiomyozyten nahe der AV-Region, sondern auch innerhalb der Kammern betroffen sind (Abb. 14).

Zur Untersuchung, ob dieses Phänomen (1) auf der Migration terminal differenzierter Kardiomyozyten über eine möglicherweise unzureichend ausgebildete AV-Grenze hinweg, (2) auf Assemblierungsproblemen bei der kardialen Fusion oder

(3) Transdifferenzierungsprozessen der kammerspezifischen Kardiomyozyten beruht, wird ein Zellverfolgungsexperiment durchgeführt.

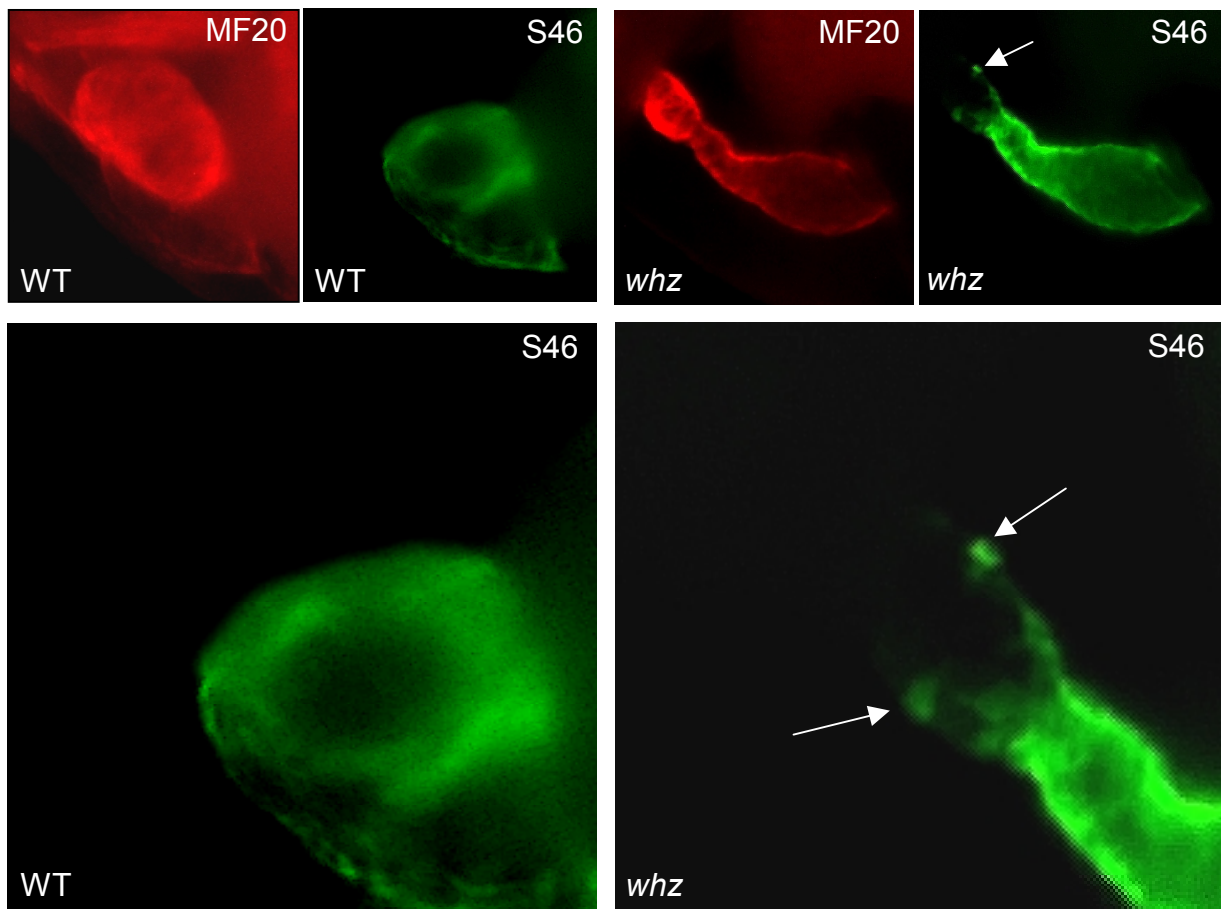


Abb. 14 Doppelimmunfärbung MF20/S46, wobei MF20 Myosin (rot) und S46 atriales Myosin (grün) markieren. In mutanten *whz*-Embryonen exprimieren einzelne ventrikuläre Kardiomyozyten atrial-spezifisches Myosin (Pfeil).

Dazu wird in die Nachkommen von heterozygoten *whz*-Paaren im 1-4-Zellstadium 5 ng eines GFP-Expressionsvektors injiziert, durch den GFP unter Kontrolle des kardialen *mhc2*-Promotors transient exprimiert wird. Die Dosis ist so gewählt, dass etwa 1-5 vereinzelte Kardiomyozyten pro Herz GFP exprimieren. 36 hpf werden die injizierten Embryonen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Zu diesem Zeitpunkt enthalten 13 von 200 der injizierten mutanten *whz*-Embryonen ausschließlich GFP-markierte ventrikuläre Kardiomyozyten und 46 ausschließlich GFP-markierte atriale Kardiomyozyten. Da innerhalb von 48 h bei keinem der mutanten *whz*- ($n = 59$) und WT-Embryonen ($n = 100$) eine Migration der markierten Kardiomyozyten über die AV-Grenze hinweg beobachtet wird, scheint Migration nicht als Ursache für atriale Zellen in *whz*-Ventrikeln in Frage zu kommen.

5.3.6 Misspezifikation der AV-Region in *weiches herz*^{m245}

5.3.6.1 Gestörte AV-Überleitung in *weiches herz*^{m245}

Mikroskopische Untersuchungen von mutanten *whz*-Embryonen 48 und 72 hpf zeigen ungewöhnliche, wellenförmige und peristaltische Kontraktionen der Herzen, die an die ersten Kontraktionen von WT-Herzen 24 hpf erinnern. Die genauere Beobachtung dieser Kontraktionen zeigt wie bei WT-Herzen 24 hpf eine offensichtliche Zell-zu-Zell-Signalweiterleitung über das gesamte Herz ausgehend vom IFT ohne Verzögerung an der AV-Grenze. Die elektrisch isolierende Zellschicht zwischen Atrium und Ventrikel, durch welche sequentielle Kontraktionen ermöglicht werden, kann durch die fehlende Expression von Genen nachgewiesen werden, die spezifisch in den ausdifferenzierten Kardiomyozyten von Atrium und Ventrikel exprimiert und am AVC u. a. durch den Tbox-Transkriptionsfaktor Tbx2 reprimiert werden [36, 52, 53, 56]. Zu diesen Genen gehört der *atriale natriuretische Faktor* (*anf*) [35, 53, 59, 60], welcher nach Ausdifferenzierung der Kardiomyozyten deren Wachstum, Proliferation und die Bildung kontraktile Proteine reguliert [102].

Da die Herzen mutanter *whz*-Embryonen ohne erkennbare Verzögerung zwischen Atrium und Ventrikel kontrahieren, wird anhand der *anf*-Expression untersucht, ob an der AV-Region kammermyokardiale Gene reprimiert werden.

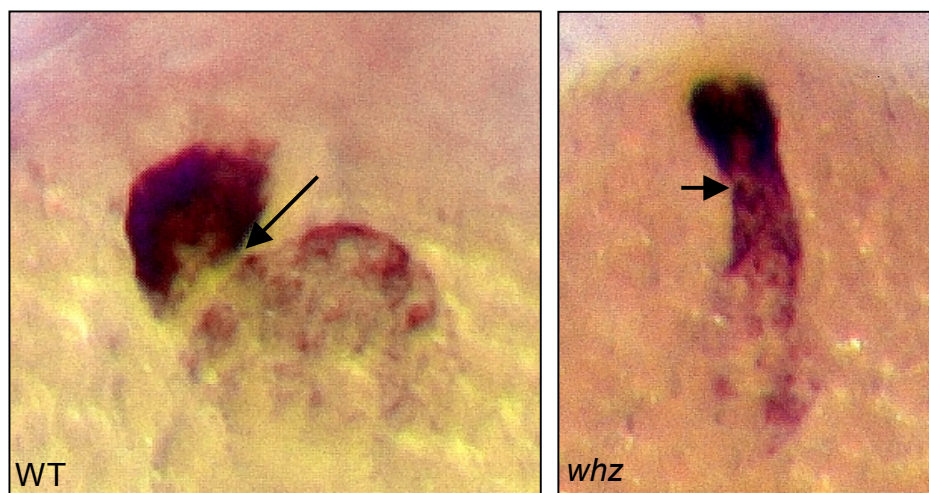


Abb. 15 Darstellung der AV-Region in gesunden Herzen durch reduzierte *anf*-Expression. Im Gegensatz zu WT- kann in *whz*-Herzen die AV-Region nicht durch eine reduzierte *anf*-Expression dargestellt werden (Pfeil).

Im Gegensatz zu WT-Embryonen, die einen *anf*-freien AV-Ring ausbilden, kann in mutanten *whz*-Embryonen die AV-Region nicht durch eine fehlende

Expression von *anf* dargestellt werden (Abb. 15). Dies weist auf eine erhebliche Entwicklungsstörung dieser Herzregion hin.

5.3.6.2 Kein spezialisiertes AV-Überleitungssystem in *weiches Herz*^{m245}

Um zu demonstrieren, dass die peristaltische Kontraktion in *whz* auf den völligen Verlust eines spezialisierten AV-Überleitungssystems zurückzuführen ist, werden Zebrafischembryonen 36, 48 und 72 hpf mit dem Ca²⁺-Kanalblocker Verapamil behandelt, welcher durch reversible Blockade spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle sowohl die Herzfrequenz (negative Chronotropie) und Kontraktilität (negative Inotropie), als auch die AV-Überleitung am AV-Knoten (negative Dromotropie) inhibiert.

Bei WT-Embryonen kann mit 500 µM Verapamil zu allen untersuchten Zeitpunkten ein kompletter AV-Block erzeugt werden, was auf die Existenz eines AV-Knotens oder zumindest von AV-Knotengewebe in Zebrafischembryonen der untersuchten Stadien hinweist. Zwar werden durch 500 µM Verapamil auch bei mutanten *whz*-Embryonen negative inotrope und chronotrope Effekte induziert, AV-Überleitungsblockaden können jedoch nicht erzeugt werden. Höhere Dosierungen von Verapamil ab 2,5 mM führen zu kompletten chronotropen Blockaden in mutanten und WT-Embryonen.

Diese Daten zeigen, dass in phänotypisch mutanten *whz*-Embryonen kein spezialisiertes AV-Überleitungssystem ausgebildet wird.

5.3.6.3 Transmyokardiale Expression von *tbx2* in *weiches herz*^{m245}

Um Ursache und Wirkung der fehlerhaften myo- und endokardialen AVC-Entwicklung in *whz* zu untersuchen, werden die Expressionsmuster verschiedener Gene untersucht, welche die myo- und endokardiale Entwicklung des AVC regulieren.

Die myokardiale AVC-Entwicklung wird in Maus und Zebrafisch u. a. durch den Tbox-Transkriptionsfaktor Tbx2 reguliert, der restriktiv am AVC exprimiert wird und dort kammermyokardiale Gene, wie *anf*, reprimiert [34, 36, 53, 56]. Die fehlende Repression von *anf* in der AV-Region von mutanten *whz*-Embryonen weist bereits auf funktionelle Tbx2-Defizite oder die fehlenden Expression von *tbx2* hin.

Im Gegensatz zu WT-Embryonen ist *tbx2* in mutanten *whz*-Embryonen deutlich stärker und gleichmäßig transmyokardial exprimiert (Abb. 16).

Diese Daten zeigen, dass in mutanten *whz*-Embryonen nicht nur in der AV-Region, sondern im gesamten *whz*-Herzen ein AVC-spezifisches Differenzierungsprogramm gestartet wird. Da *anf* dennoch in Atrium und Ventrikel exprimiert wird, wird dort gleichzeitig ein kammerkardiomyozytenspezifisches Differenzierungsprogramm gestartet.

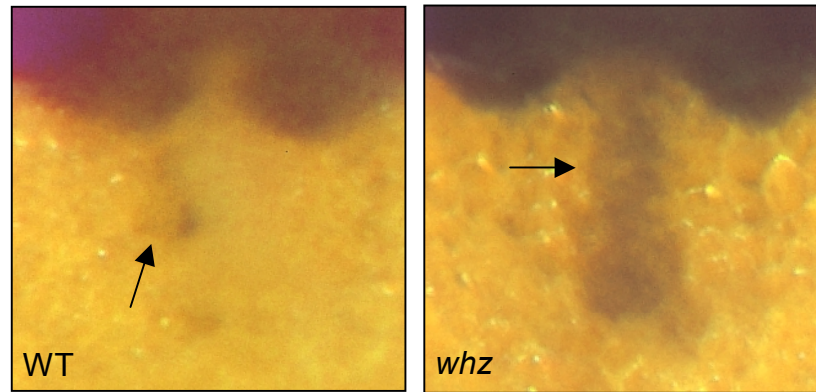


Abb. 16 Expressionsverteilung von *tbx2* in WT- und mutanten *whz*-Embryonen 48 hpf (ISH). Während *tbx2* in WT-Embryonen restriktiv am AVC (Pfeil) exprimiert wird, ist die *tbx2*-Expression in mutanten *whz*-Embryonen gleichmäßig transmyokardial.

5.3.6.4 Transmyokardiale Expression von *versican* in *weiches herz*^{m245}

Um die Defekte in der AVC-Entwicklung in mutanten *whz*-Embryonen weiter zu evaluieren, wird die kardiale Expression des extrazellulären Matrixproteoglykans *versican* untersucht, einem Mitglied der Chondroitinsulfat-Proteoglycan-Familie. In embryonalen Herzen von Zebrafisch und Maus wird es in den mesenchymalen Kondensationen des AVC exprimiert, wo es eine entscheidende Rolle in Zelladhäsion, -migration, -proliferation und Differenzierungen des Muskel- und Nervengewebes spielt [58, 128, 131] und damit zur AVC-Entwicklung beiträgt.

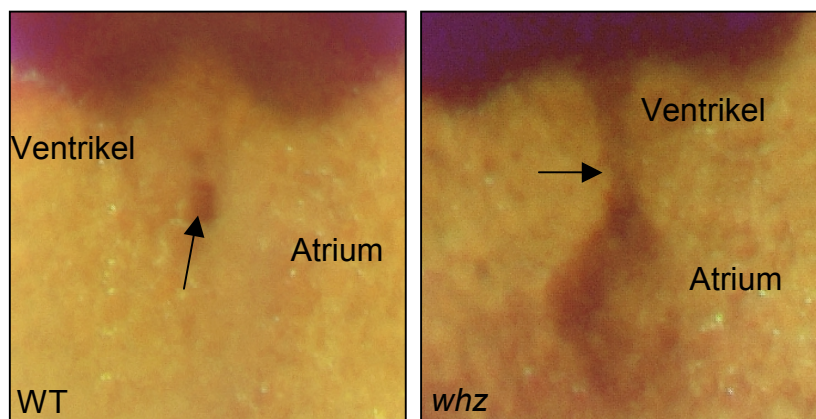


Abb. 17 Expressionsverteilung von *versican* in WT und mutanten *whz*-Embryonen 48 hpf (ISH). Während *versican* in WT-Embryonen restriktiv am AVC (Pfeil) exprimiert wird, ist die *versican*-Expression in mutanten *whz*-Embryonen gleichmäßig transmyokardial.

ISH-Analysen von WT-Embryonen 48 hpf zeigen eine starke Expression von *versican* am AVC. Im Gegensatz dazu ist *versican* in mutanten *whz*-Embryonen transmyokardial exprimiert (Abb. 17). Eine zum WT vergleichbare Lokalisation an der AV-Grenze wird nicht festgestellt.

Wie die transmyokardiale Expression von *tbx2* weist das Expressionsmuster von *versican* auf ein transkardial gestartetes AVC-spezifisches Differenzierungsprogramm hin.

5.3.6.5 Transmyokardiale Expression von *gata5* in *weiches herzm245*

Um die AVC-Defekte weiter aufzuarbeiten, wird die kardiale Expressionsverteilung des GATA-Transkriptionsfaktors *gata5* analysiert, welcher die myokardiale und mesenchymale Differenzierung des AVC durch die Transkriptionsfaktoren One eye pinhead und Bone morphogenetic protein 2, aber auch die kardiale Fusion und Proliferation des ventrikulären Gewebes reguliert [117, 152].

Während ab 42 hpf WT-Embryonen *gata5* ausschließlich am OFT und AVC exprimieren, ist *gata5* in mutanten *whz*-Embryonen transmyokardial exprimiert, wobei sich die AV-Region nicht durch eine stärkere Expression hervorhebt (Abb. 18). Das Expressionsmuster von *gata5* in *whz*-Embryonen entspricht damit den veränderten Expressionsmustern von *tbx2* und *versican*, was die These transmyokardial gestarteter AVC-spezifischer Differenzierungsprozesse in *whz* festigt.

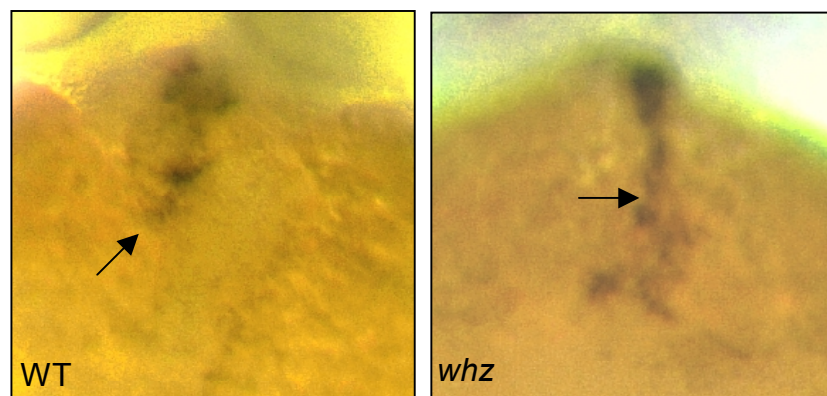


Abb. 18 Expressionsverteilung von *gata5* in WT und mutanten *whz*-Embryonen 48 hpf (ISH). Während *gata5* in WT-Embryonen restriktiv am AVC (Pfeil) und OFT exprimiert wird, ist die *gata5*-Expression in mutanten *whz*-Embryonen gleichmäßig transmyokardial.

5.3.6.6 Transendokardiale Expression von *notch1b* in *weiches herzm245*

Die myokardiale AVC-Entwicklung ist in *whz* sowohl auf funktioneller, als auch auf molekularer Ebene stark gestört. Darüber hinaus zeigen histologische Schnitte mutanter *whz*-Embryonen, dass keine Rekrutierung endokardialer Zellen am AVC

stattfindet und keine Herzklappen gebildet werden. Dies zeigt, dass der Prozess der EMT, durch den fibröses AV-Klappengewebe entsteht, in *whz* ebenfalls gestört ist.

Um EMT-Prozesse innerhalb von *whz*-Herzen zu verfolgen, wird das Expressionsmuster von *notch1b* bestimmt, welches die EMT reguliert und die Ausbildung der Herzklappen am AVC und OFT steuert [41, 45, 127, 145]. Seine kardiale Expression ist in WT-Zebrafischembryonen auf das Endokard des OFT und AVC beschränkt [12, 15].

ISH-Analysen in mutanten *whz*-Embryonen zeigen ein stark gestörtes Expressionsmuster von *notch1b*. Wie für *tbx2*, *gata5* und *versican* beobachtet, wird *notch1b* hier zwischen 48 und 96 hpf nicht spezifisch am AVC, sondern transkardial exprimiert (Abb. 19). Je nach Ausprägung der intraatrialen Septierungen, die oft, aber nicht immer Herzklappen und damit Anzeichen von EMT-Aktivität zeigen, variiert dabei das *notch1b*-Expressionsmuster in mutanten *whz*-Embryonen sehr stark. Ein Hervorhebung der AV-Region durch eine stärkere Expression wird jedoch in keinem der untersuchten phänotypisch mutanten *whz*-Embryonen beobachtet.

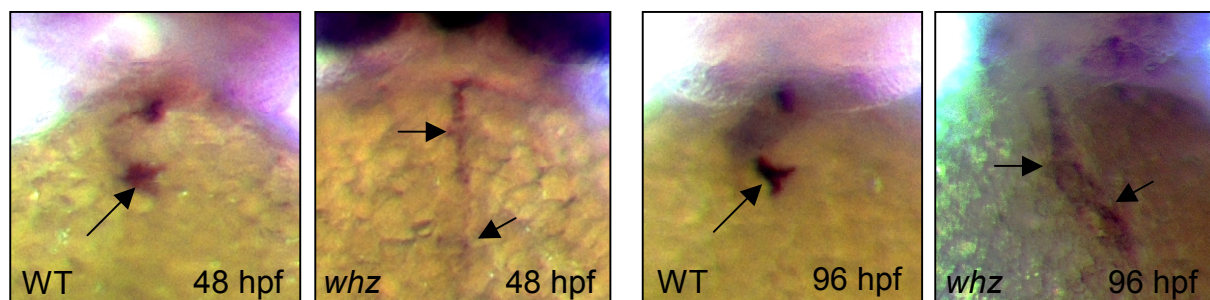


Abb. 19 Expressionsverteilung von *notch1b* in WT und mutanten *whz*-Embryonen 48 hpf (ISH). Während *notch1b* in WT-Embryonen restriktiv am AVC (Pfeil) und OFT exprimiert wird, ist die *notch1b*-Expression in mutanten *whz*-Embryonen transendokardial, wobei verstärkt der Ventrikel und die intraatrialen Septierungen *notch1b* exprimieren (Pfeil).

5.3.6.7 Fehlende Induktion der AVC-Entwicklung in *weiches herzm245*

Die myo- und endkardiale Entwicklung des AVC in *weiches herzm245* ist bereits 48 hpf stark gestört. Um weiterführend die Ursachen dafür zu untersuchen, wird die Expression des *bone morphogenetic protein-4* (*bmp4*) untersucht, welches im Zebrafisch der früheste molekulare Marker des AVC darstellt und dort die Kommunikation zwischen Endokard und Myokard reguliert, dabei FGF-signaling induziert und lokal die Proliferation der Kardiomyozyten steuert [70, 74, 91].

ISH-Analysen von Embryonen 36 und 48 hpf zeigen bei WT-Embryonen eine Lokalisation von *bmp4* am IFT, AVC und OFT. Im Gegensatz dazu fehlt bei mutanten

whz-Embryonen die *bmp4*-Expression am AVC vollständig und die sinuatriale Expression von *bmp4* ist ab 48 hpf teilweise auf das gesamte Atrium erweitert (Abb. 20).

Dies zeigt, dass bereits die Initialisierung der AVC-Entwicklung nach der kardialen Fusion in *whz* nicht stattfindet.

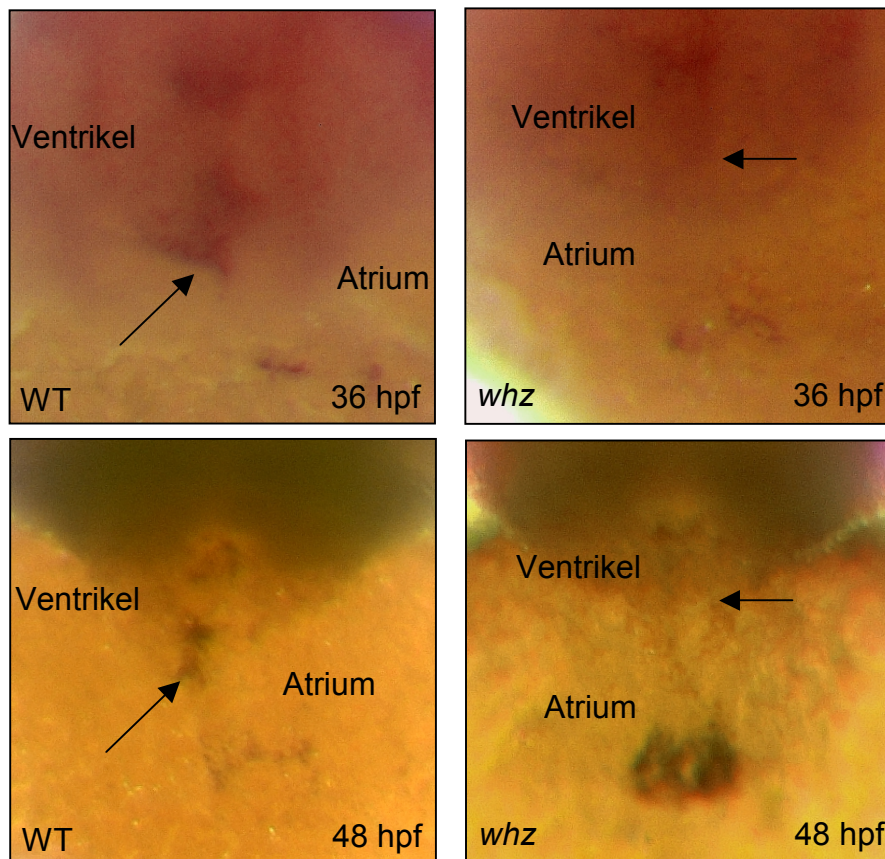


Abb. 20 Expressionsverteilung von *bmp4* in WT und mutanten *whz*-Embryonen 36 und 48 hpf (ISH). Während *bmp4* in WT-Embryonen restriktiv am IFT, AVC (Pfeil) und OFT exprimiert wird, wird *bmp4* in mutanten *whz*-Embryonen von 36 hpf an nur am IFT und OFT exprimiert.

Um zu demonstrieren, dass in mutanten *whz*-Embryonen das Atrium und nicht ein vergrößerter IFT *bmp4* exprimiert und damit ein AVC-spezifisches Differenzierungsprogramm startet, wird eine kombinierte ISH-Immunfärbung mit der *bmp4*-Riboprobe und dem atrial-spezifischen S46-Antikörper durchgeführt.

Dabei kann erstmals an WT-Embryonen gezeigt werden, dass die *bmp4*-exprimierenden Kardiomyozyten atrialen Ursprungs sind, da diese gleichzeitig durch S46 markiert werden (Abb. 21). Außerdem kann an histologischen Schnitten der mutanten *whz*-Embryonen bestätigt werden, dass am Übergang von atrialen zu ventrikulären Kardiomyozyten kein *bmp4* exprimiert wird, während atriale Kardiomyozyten *bmp4* exprimieren (Abb. 21).

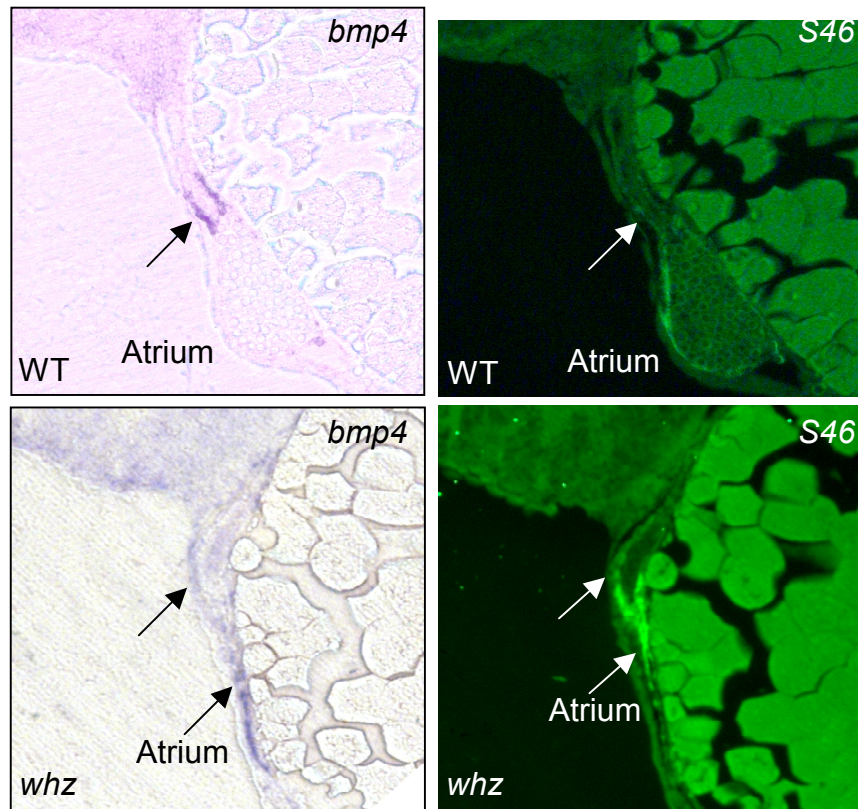


Abb. 21 Expressionsverteilung von *bmp4* in WT- und mutanten *whz*-Embryonen 48 hpf. Die Doppelfärbung gegen *bmp4* und atriales Myosin zeigt, dass die initial *bmp4*-markierten Kardiomyozyten atrialen Ursprungs sind (Pfeil). Darüber hinaus wird in mutanten *whz*-Embryonen die fehlende *bmp4*-Expression in der AV-Region (Pfeil) und die ungewöhnliche atriale *bmp4*-Expression gezeigt (Pfeil).

5.3.6.8 Normale Vaskulo- und Angiogenese in *weiches herz*^{m245}

Um zu demonstrieren, dass die in mutanten *whz*-Embryonen gestörte Entwicklung des AVC und nicht ein Defekt in der Vaskulo- oder Angiogenese für die nur schwache Blutzirkulation verantwortlich ist, wird eine Mikroangiographie mit fluoreszenzmarkierten Latexkügelchen durchgeführt, die direkt in den IFT injiziert werden.

Bei der Injektion in mutante *whz*-Embryonen 48 hpf wird wie beim WT die normale Entwicklung der dorsalen Aorta, der Kardinalvene, der intersegmentalen Gefäße und des kaudalen Venengeflechtes festgestellt (Abb. 22).

Dies zeigt, dass ausschließlich der kardiale *whz*-Phänotyp für die geringe Blutzirkulation und den embryonalen Tod der mutanten *whz*-Embryonen verantwortlich ist.

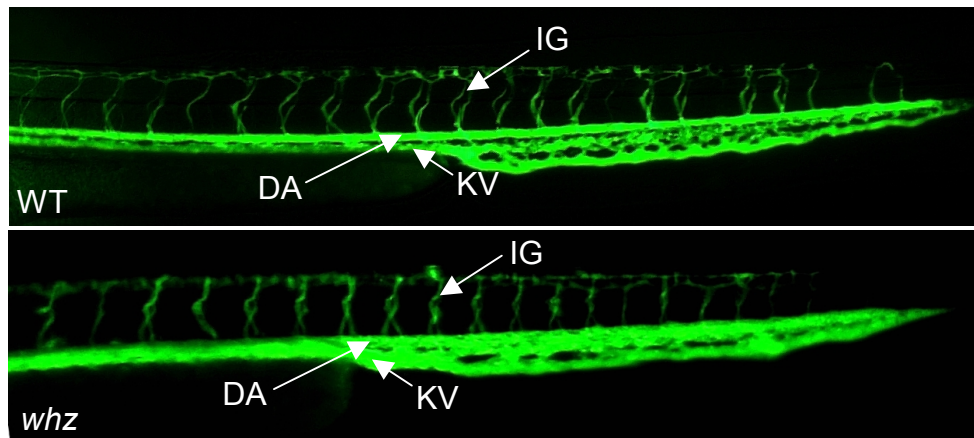


Abb. 22 Mikroangiographie mit FITC-markierten Latexkügelchen von mutanten *whz*- und WT-Embryonen 48 hpf zeigt normale Vaskulo- und Angiogenese in *whz*. DA = dorsale Aorta, IG = intersegmentale Gefäße, KV = Kardinalvene.

5.4 Positionelle Klonierung von *weiches herz*^{m245}

5.4.1 Genetische Kartierung von *weiches herz*^{m245}

Der für den *whz*-Phänotyp verantwortliche Gendefekt wird durch positionelle Klonierung identifiziert. Dazu wird mit je 2 Pools aus phänotypisch mutanten und nicht-mutanten Embryonen der WIK- und TL-Auszucht von *whz* eine initiale Kopplungsanalyse mit 214 CA-Markern durchgeführt, wobei eine eindeutige Kopplung von *whz* zu *Linkage group* 16 festgestellt wird. Anschließend wird der *whz*-Mutationslocus anhand der publizierten genetischen Karten des Zebrafischs und durch die Analyse von 3500 phänotypisch mutanten *whz*-Embryonen zwischen die CA-Marker Z1215 und Z6240 kartiert, die ein genetisches Intervall von 0,2 cM, etwa 250 kb, umfassen. Dieses wird anschließend durch einen *yeast artificial chromosome* (YAC)-und einen *bacterial artificial chromosome* (BAC)-walk mit 4 BACs physikalisch überbrückt. Anschließend wird das physikalische *whz*-Intervall durch Sequenzanalysen von YAC- und BAC-Enden mit an- und durchsequenzierten BACs und einer aus kurzen genomischen Fragmenten fehlerhaft assemblierten Version des Zebrafischgenoms komplett mit Sequenzinformation gefüllt. Das physikalische *whz*-Intervall wird daraufhin weiter genetisch eingeeengt. Das kleinste Mutationsintervall für *whz* wird durch je eine flankierende Rekombination festgelegt (entspricht 0,6 cM) und enthält 2 Gene, *tbx20* und *zgc:56020* (Abb. 23).

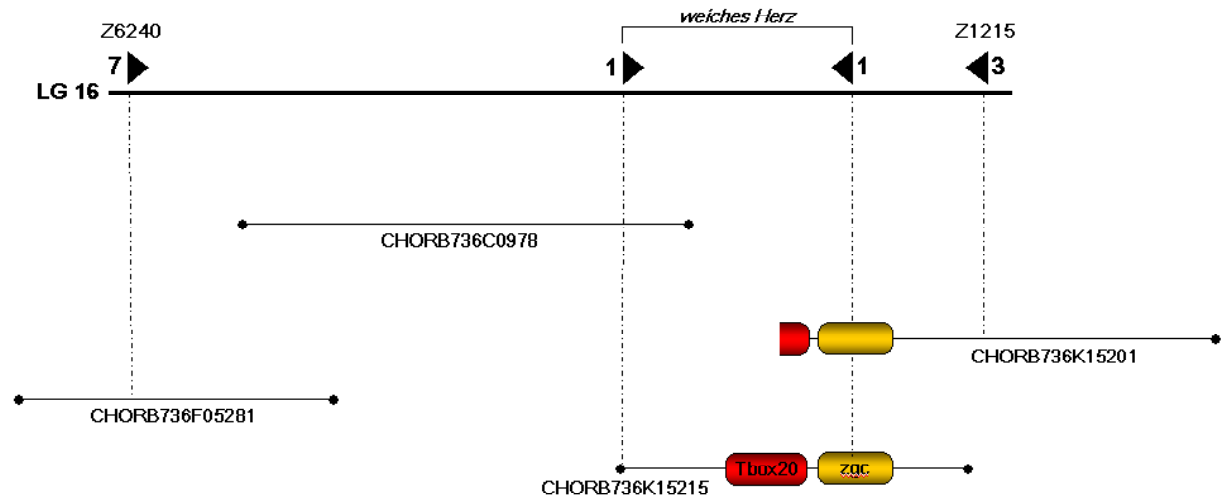


Abb. 23 Klonierungsschema für *whz*. Das kleinste genetische *whz*-Intervall wird durch je eine flankierende Rekombination festgelegt, liegt auf dem BAC CHORB736K15215 und beinhaltet die Gene *tbx20* und *zgc:56020*. Die Angaben entsprechen entkoppelten Embryonen in 3500 Meiosen.

5.4.2 Kandidatengenversuche mit *tbx20* und *zgc:56020*

Zur Untersuchung, welches der beiden Kandidatengene für den *whz*-Phänotyp verantwortlich ist, werden drei parallele Ansätze gewählt. Zum einen wird (1) die kardiale Expression beider Gene durch *in situ*-Hybridisierung untersucht. Parallel dazu werden (2) von WT- und mutanten *whz*-Embryonen gDNA und mRNA beider Gene sequenziert und (3) beide Gene durch *Morpholino antisense-Knockdown* inaktiviert.

5.4.3 Kardiale Expression von *tbx20* und *zgc:56020* während der Herzentwicklung

Um zu untersuchen, ob die beiden Kandidatengene durch eine frühembryonale kardiale Expression die embryonale Herzentwicklung beeinflussen können, werden die Expressionsmuster von *tbx20* und *zgc:56020* mittels *in situ*-Hybridisierung an Zebrafischembryonen im 48 hpf-Stadium bestimmt.

Dabei wird festgestellt, dass *zgc:56020* ubiquitär und damit auch im embryonalen Herzen exprimiert wird (Abb. 24). *tbx20* dagegen wird selektiv in Stammhirn, Motoneuronen, Aorta, Kiemenbögen und dem Herzen exprimiert, wobei sich die kardiale Expression im WT hauptsächlich auf den OFT und Teile des AVC beschränkt. Beide Gene sind ebenfalls in den Herzen mutanter *whz*-Embryonen exprimiert, wobei die *tbx20*-Expression ausgeprägter ist als im WT.

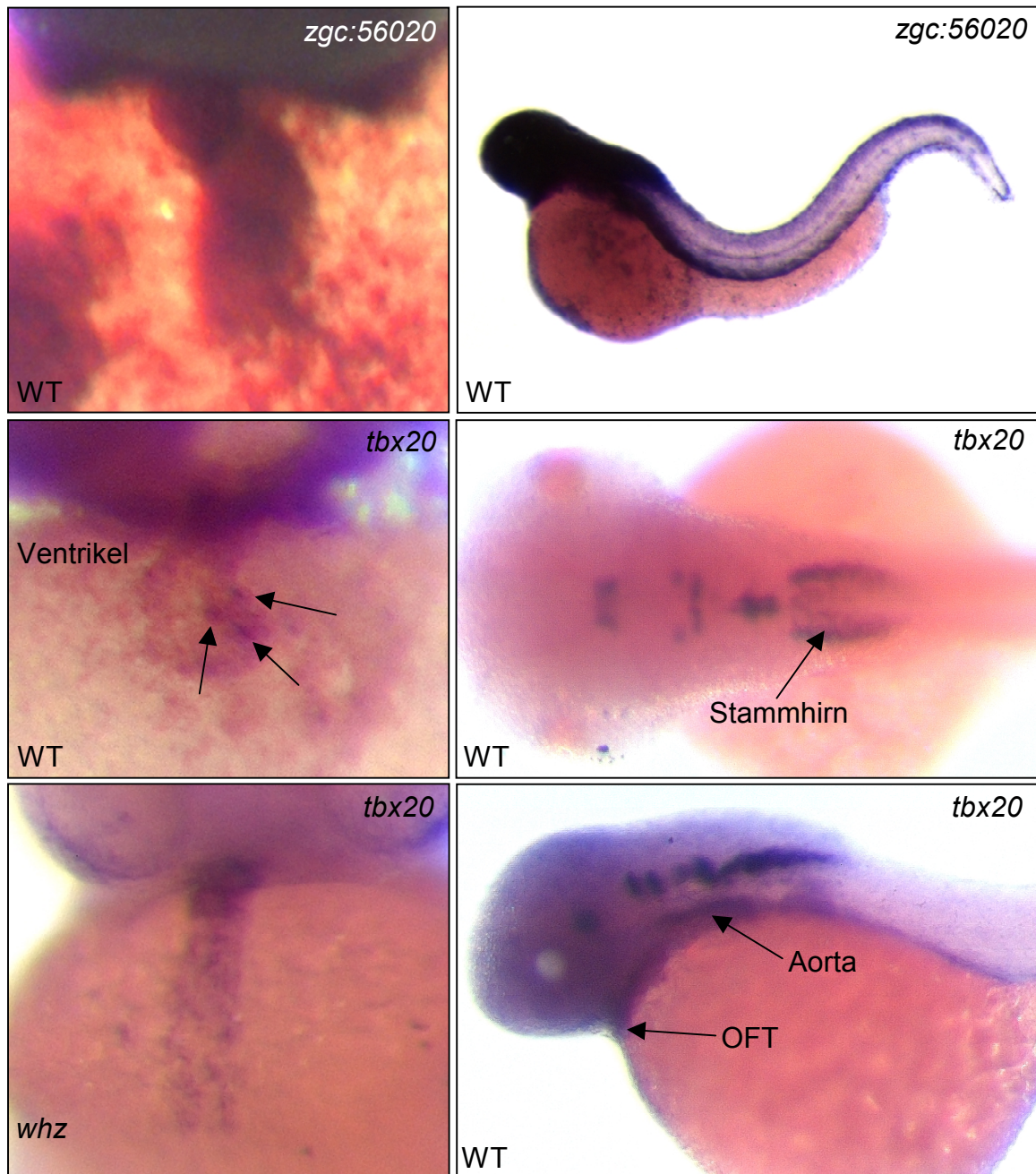


Abb. 24 Expressionsverteilung von *tbx20* und *zgc:56020* in Zebrafischembryonen 48 hpf (ISH). *zgc:56020* und *tbx20* werden u. a. kardial exprimiert. Die kardiale Expression von *tbx20* ist hauptsächlich im OFT und AVC lokalisiert, wobei sich die Expression am AVC auf 3 Punkte (Pfeile, wahrscheinlich die Klappenansätze) konzentriert. Beide Gene sind sowohl in WT-, als auch in mutanten *whz*-Embryonen exprimiert, wobei *tbx20* in *whz*-Atria deutlich stärker exprimiert wird.

Da für beide Gene eine kardiale Expression in der Herzentwicklung von WT- und mutanten *whz*-Embryonen nachgewiesen werden kann, kann durch diesen Versuch keines der Gene als Kandidat für *whz* ausgeschlossen werden.

5.4.4 *Morpholino antisense-Knockdown* von *tbx20* phänotypisiert *weiches herz*^{m245}

Um durch Vergleich der *Knockdown*-Phänotypen von *tbx20* und *zgc:56020* mit dem *whz*-Phänotyp das mutagenisierte Gen zu identifizieren, werden gegen die translatorischen Start-Stellen (Start-ATG) von *tbx20* und *zgc:56020* *Morpholino antisense*-Oligonukleotide hergestellt (MO1-*tbx20*, MO-*zgc:56020*) und diese in WT-Zebrafischembryonen im 1-4-Zellstadium injiziert.

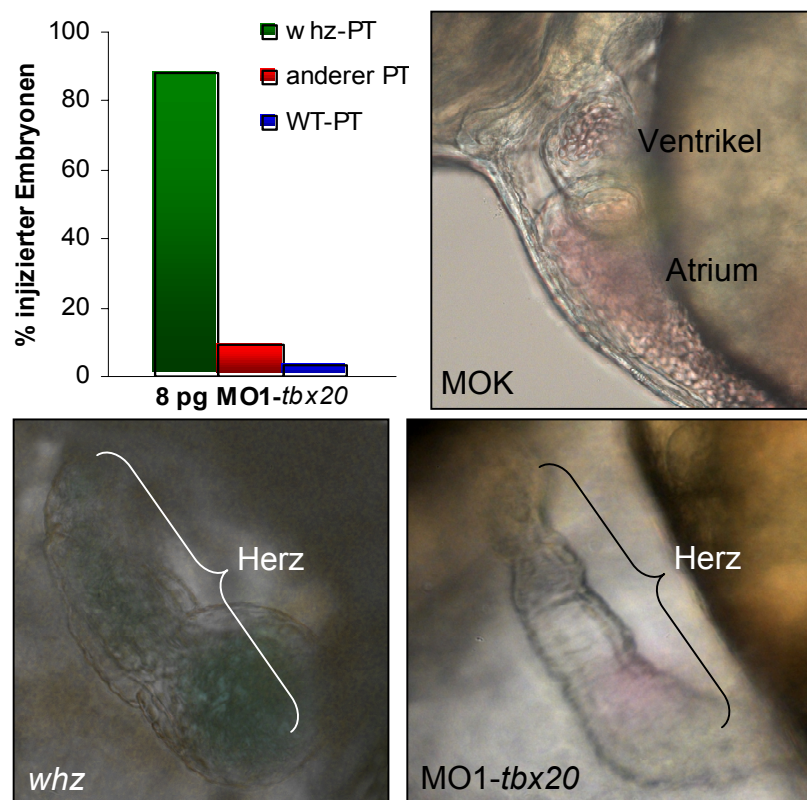


Abb. 25 Phänotypisierung des *whz*-Phänotyps durch *tbx20*-Knockdown. Der *Morpholino antisense-Knockdown* von *tbx20* mit MO-*tbx20* phänotypisiert den *whz*-Phänotyp in 90 % aller injizierten Embryonen 48 hpf. MOK = Kontroll-Morpholino mit Zufallssequenz.

Durch die Injektion von 12 pg MO-*zgc:56020* wird zwar bei 40 % der injizierten Embryonen die Herzdrehung inhibiert, der *whz*-Phänotyp kann jedoch nicht phänotypisiert werden (nicht gezeigt). Dagegen kann durch die Injektion von 8 pg MO1-*tbx20* in 90 % der injizierten Embryonen ($n = 200$) der kardiale *whz*-Phänotyp vollständig phänotypisiert werden (Abb. 25). Wie bei mutanten *whz*-Embryonen scheint bei MO1-*tbx20*-injizierten Embryonen die Herzentwicklung ab 24 hpf zu sistieren, wodurch sich zunehmend Perikardödeme und Blutstaus bilden. Bei allen MO1-*tbx20*-injizierten Embryonen findet keine Herzdrehung statt. Darüber hinaus

sind die Ventrikel verkleinert, die Atria vergrößert und die Kontraktionen peristaltisch ohne erkennbare Verzögerung zwischen Atrium und Ventrikel.

Dieses Experiment zeigt, dass in *whz* eine *loss of function*-Mutation in *tbx20*, wie sie durch den *Morpholino-Knockdown* simuliert wird, die Entwicklung des AVC inhibiert.

5.4.5 Insertionsmutation in *whz-tbx20*-mRNA

Um den ENU-induzierten Gendefekt in *tbx20* zu identifizieren, werden von WT- und mutanten *whz*-Embryonen die translatierten und untranslatierten Regionen von *tbx20* auf DNA- und RNA-Ebene amplifiziert, kloniert und sequenziert. Da auch etwa 12 % der heterozygoten *whz*-Embryonen den *whz*-Phänotyp zeigen, werden die phänotypisch mutanten *whz*-Embryonen vor der RNA-Extraktion mit Hilfe der *tbx20*-flankierenden CA-Marker Z1215 und Z6240 genotypisiert. Die benötigte DNA wird aus den Schwänzen der Embryonen gewonnen.

Bei der Sequenzierung mutanter cDNA von *tbx20* werden an Position 1056 zwei Insertionen von 3 (TAG) bzw. 6 (CTGTAG) Nukleotiden identifiziert, welche für die zusätzlichen Aminosäuren Serin (S) bzw. Cystein-Serin (CS) an Position 296 des Tbx20-Proteins kodieren (Abb. 26). Obwohl die RNA genotypisierter homozygot-mutanter *whz*-Embryonen für die Sequenzierung verwendet wird, kann dennoch in 3 von 20 sequenzierten *tbx20*-Klonen von *whz*-cDNA WT-*tbx20*-RNA nachgewiesen werden. Keiner der 20 sequenzierten *tbx20*-Klone aus cDNA von WT-Embryonen oder aus cDNA von nicht-*whz*-Embryonen (WIK-WT) zeigt dagegen eine Insertion.

Die gleichzeitig durchgeführte Sequenzierung der mutanten *whz*-cDNA von *zgc:56020* ergibt keine Veränderungen im Vergleich zum WT.

Da im kleinsten *whz*-Intervall nur *tbx20* und *zgc:56020* liegen und die identifizierten Insertionen in *whz-tbx20* ausschließlich in mutanten *whz*-Embryonen nachgewiesen werden können, müssen diese für den *loss of tbx20-function*-Phänotyp verantwortlich sein.

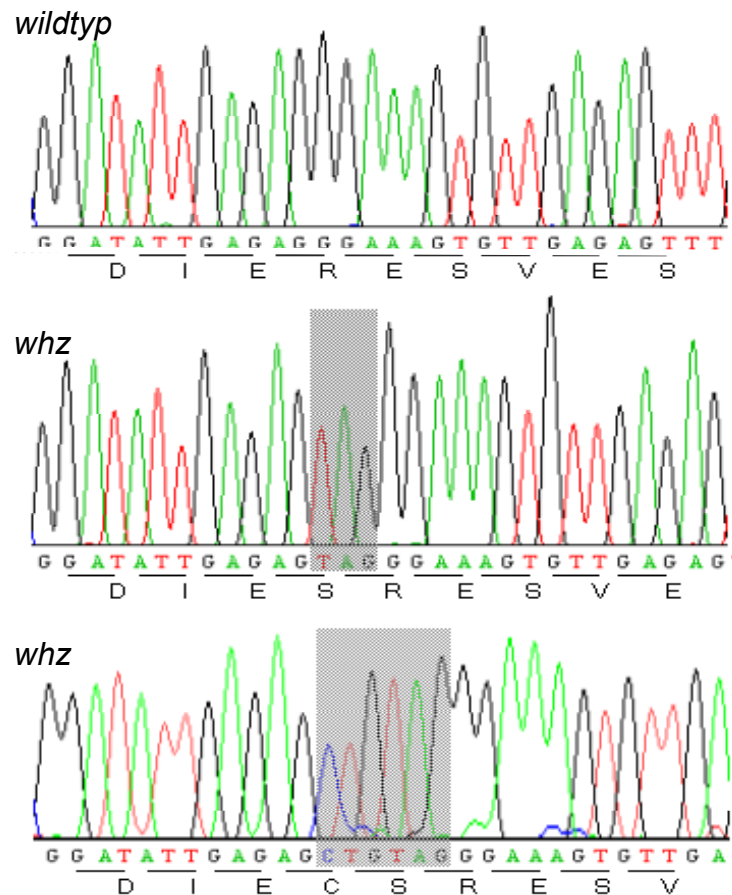


Abb. 26 Sequenzierung von *tbx20*-cDNA aus WT- und mutanten *whz*-Embryonen. Die cDNA mutanter *whz*-Embryonen enthält 3 bzw. 6 zusätzliche Nukleotide, die zur Insertion zusätzlicher Aminosäuren, S bzw. CS, führt (grau schattiert).

Die in *whz-tbx20* identifizierten Insertionen treten an der Grenze zwischen Exon 6 und 7 inmitten eines über alle Spezies hinweg hoch konservierten Proteinmotivs auf und werden durch alternatives Splicen erzeugt. Dieses konservierte Proteinmotiv befindet sich zwischen der DNA-bindenden Tbox-Domäne und der transkriptorischen Aktivatorodomäne von Tbx20 (Abb. 27, 28).

whz	MEYTS	SPKPOLSSRANAFSIAALMSSG	KT	KDKES	ENTIKPLEQFVEKSSC	HPN	LGDL	PP
Xenopus	MEYTP	SPKPOLSSRANAFSIAALMSSG	TP	KDKEAQ	ESTIKPLEQFVEKSSC	SQPI	IGDIS	IS
Maus	MEFTA	SPKPOLSSRANAFSIAALMSSG	GP	KEKEAA	ENTIKPLEQFVEKSSC	AQPL	GE	LT

whz	LETH	SD	FSS	GGGT	G	GAP	LCTEPLIPTTP	GV	PSEEMAKISCS	LET	KELWDK	FHEL	GTE	M
Xenopus	VDSH	GE	FTN	- - - -	S	PSSL	LCTEPLIPTTP	IIP	SEEMAKISCS	LET	KELWDK	FH	D	LGTE
Maus	LDAH	AE	FG	GGGS	P	S	PSSL	LCTEPLIPTTP	IIP	SEEMAKI	AC	SLET	KELWDK	FHEL

whz	ITKSGRRMFPTIRVSFSGVD	P	DAKYIVLMDIVPVDN	KRYRYAYHRS	SSWL	VAGKAD	PPL	PA
Xenopus	ITKSGRRMFPTIRVSFSGVD	A	DAKYIVLMDIVPVDN	KRYRYAYHRS	AWL	VAGKAD	PPL	PA
Maus	ITKSGRRMFPTIRVSFSGVD	P	ESKYIVLMDIVPVDN	KRYRYAYHRS	SSWL	VAGKAD	PPL	PA

whz	RLYVHPDSPFTGEQLLKQMV	SFEKVKLTNNEL	DQHGHIILNS	MHKYQPRVH	IIKK	KDHTA
Xenopus	RLYVHPDSPFTGEQLLKQMV	SFEKVKLTNNEL	DQHGHIILNS	MHKYQPRVH	IIKK	KDHTA
Maus	RLYVHPDSPFTGEQLLKQMV	SFEKVKLTNNEL	DQHGHIILNS	MHKYQPRVH	IIKK	KDHTA



Abb. 27 Sequenzvergleich von *whz*-, *Xenopus*- und Maus-Tbx20. Die Abbildung zeigt die große Homologie zwischen den untersuchten Spezies und die in *whz* identifizierten Insertionen innerhalb eines stark konservierten Proteinmotivs (Pfeil).

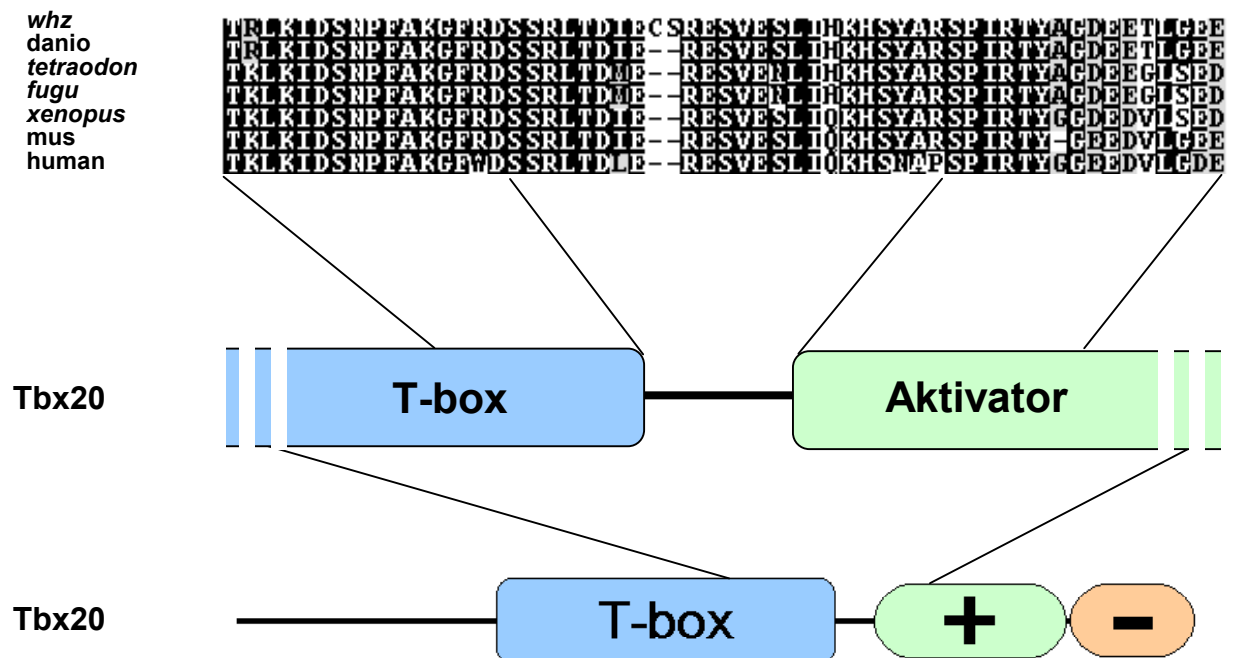


Abb. 28 Domänenstruktur von Tbx20 und Position der Insertionen in *whz*. Die in mutanter *tbx20*-cDNA identifizierten Insertionen treten innerhalb eines hoch konservierten Proteinmotivs zwischen der DNA-bindenden Tbox- und der transkriptionalen Aktivatordomäne (+) auf.

Die Sequenzierung der Splicedonor- und Spliceakzeptorstellen von Intron 6 in WT- und homozygot-mutanten *whz*-Embryonen ergibt keine Veränderung der *whz*-Sequenz im Vergleich zum WT. Sie zeigt jedoch, dass beide Insertionen das Ergebnis eines alternativen Splicens von Intron 6 sind, wobei das Splicosom als Spliceakzeptorsequenz nicht wie im WT Intron-**AG**-Exon, sondern Intron-**TG**-Exon erkennt (Abb. 29). Weitere Sequenzanalysen von Intron 6 ergeben, dass in den mutanten *whz*-Embryonen eine potentielle *branching point*-Erkennungssequenz an Position -66 durch eine C→T-Punktmutation verändert ist (Abb. 29). Nach Klein et al.

[79] können Mutationen in *branching point*-Erkennungssequenzen alternative Splicevorgänge induzieren. Da die ebenfalls in Intron 6 identifizierten Insertionen und Deletionen nicht durch ENU induziert werden können (ENU induziert nur Punktmutationen und sehr selten Deletionen einzelner Nukleotide), sondern stammspezifische Polymorphismen darstellen, ist die C→T-Punktmutation innerhalb der potentiellen *branching point*-Erkennungssequenz als ursächlich für die Insertionen in *tbx20* und damit für den *whz*-Phänotyp anzusehen.



Abb. 29 Sequenzierung der Intron-Exon-Grenze von Intron 6/Exon 7 von *tbx20*. Die Integration von 3 bzw. 6 Nukleotiden in *whz-tbx20* beruht auf einer C→T-Punktmutation (-66 bp) am Anfang der *branching point*-Erkennungssequenz (B₋₆₆) von Intron 6 (Markierung). Die Deletion und Insertion in *whz*-Intron 6 können im Gegensatz zur Punktmutation nicht durch ENU induziert worden sein und sind stammspezifische Polymorphismen.

5.4.6 Reduzierte Splice-Aktivität von Intron 6 in *weiches herz*^{m245}

Mutationen der *branching point*-Erkennungssequenz können alternatives Splicen und/oder den Verlust jeglicher Spliceaktivität an dieser Stelle induzieren, was zu einer Integration des Introns führen würde [79, 108]. Um den Splicevorgang zwischen Exon 6 und 7 zu quantifizieren, wird eine quantitative *Real-Time* RT-PCR mit für den Splicenachweis spezifischen Primerpaaren (Abb. 30 A) durchgeführt und das Quantifizierungsergebnis gegen die Expression von 18S-RNA als *housekeeping gene* normalisiert. Die untersuchten RNA-Proben werden aus Herzen von WT- und mutanten *whz*-Embryonen isoliert.

Dieses Experiment führt zur Entdeckung einer zweiten *Tbx20*-Isoform, *tbx20b*, die sowohl in WT-, als auch in mutanten *whz*-Embryonen nachgewiesen werden kann. Sie entsteht durch Inhibierung des Splicevorgangs und damit Integration von Intron 6, welches wenige Basenpaare nach seinem Anfang ein Stop-Codon enthält

(Abb. 30 A). Die Sequenzierung von *tbx20b* zeigt, dass in dieser Isoform durch das frühe Stopcodon beide transkriptionalen Regulatorelemente fehlen.

Die Quantifizierung des Splicevorgangs und damit von *tbx20* und *tbx20b* demonstriert, dass in WT-Embryonen 38 % der *tbx20*-Transkripte Intron 6 enthalten und damit *tbx20b* entsprechen. In mutanten *whz*-Embryonen beträgt dagegen der Anteil von *tbx20b* 47 %, was einer Reduktion der Spliceaktivität um 27 % entspricht (Abb. 30 B). Die Sequenzierung von 20 *tbx20*-Klonen von cDNA aus mutanten *whz*-Embryonen ergibt, dass die übrigen 53 % der *tbx20*-Transkripte zu 80 % durch die Insertion von 3 und 5 % durch die Insertion von 6 Nukleotiden geschädigt sind, was zu einer deutlichen Reduzierung intakter *tbx20*-Transkripte, nicht aber zum kompletten *Knockout* von *tbx20* führt. Allerdings zeigt die Tatsache, dass 100 % der homozygot-mutanten und bis zu 12 % der heterozygoten *whz*-Embryonen den typischen *whz*-Phänotyp, und außerdem bis zu 25 % der heterozygoten *whz*-Embryonen AV-Überleitungsstörungen zeigen, dass die Insertionen zumindest partiell dominant wirken.

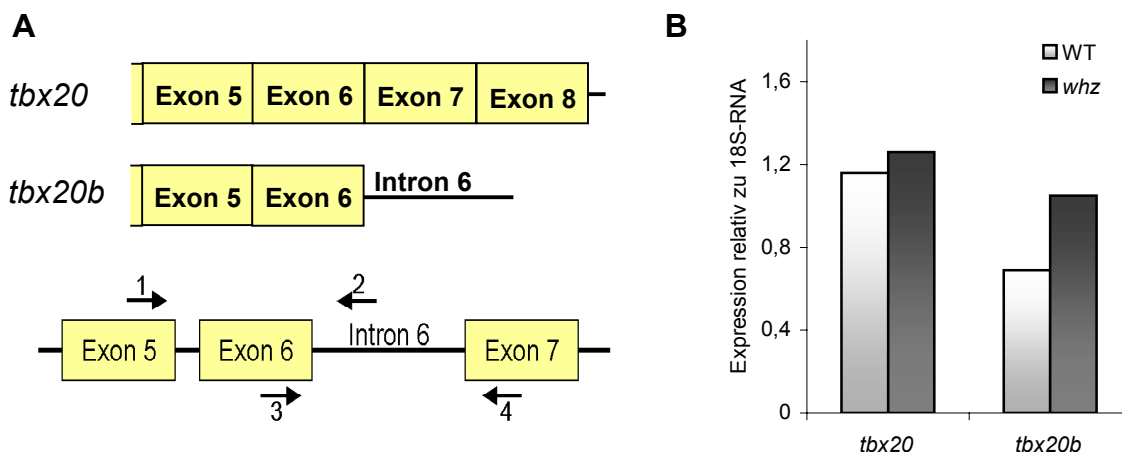


Abb. 30 Quantifizierung von *tbx20* (Primer 3 und 4) und *tbx20b* (Primer 2 und 3) in embryonalen Herzen ergibt neben einer insgesamt leicht erhöhten Expression von *tbx20* eine gesteigerte Expression von *tbx20b*, die einer um 27 % reduzierten Spliceaktivität von Intron 6 entspricht.

5.5 Genetischer rescue von *whz* durch Expression von WT-*tbx20*

Um zu zeigen, dass der *whz*-Phänotyp durch eine *loss of function*-Mutation von *tbx20* verursacht wird, wird versucht, durch Expression von Zebrafisch-*tbx20* in mutanten *whz*-Embryonen die Ausprägung des *whz*-Phänotyps zu verhindern und eine normale Entwicklung des AVC zu gewährleisten. Dazu wird die DNA von BAC CHORB736K15215, der alle kodierenden Exons von *tbx20* und die potentiellen Promotorsequenzen enthält, und *tbx20*-mRNA in die Nachkommen heterozygoter

whz-Fische injiziert. Die injizierten Embryonen werden 48 hpf auf ihren kardialen Phänotyp hin überprüft, gesammelt und mit den *whz*-Locus-flankierenden CA-Markern Z1215 und Z6240 genotypisiert.

Durch die Injektion von 50 pg CHORB736K1521515-DNA kann bei 14 % der injizierten mutanten *whz*-Embryonen (n = 29) eine normale AVC-Entwicklung gewährleistet werden (Abb. 31). Da CHORB736K15215 auch die Gene *zgc:56020* und *smarcc1* mit ihren potentiellen Promotorsequenzen enthält, wird auch *tbx20*-mRNA in mutante *whz*-Embryonen injiziert. Durch die Injektion von 10 pg kann bei 20 % der injizierten mutanten *whz*-Embryonen (n = 30) die Ausprägung des *whz*-Phänotyps verhindert werden (Abb. 31). Darüber hinaus kann durch die mRNA-Injektion in WT-Embryonen ein starker Überexpressionsphänotyp erzeugt werden, der sich durch gestörte AVC-Entwicklung und fehlende Herzdrehung auszeichnet.

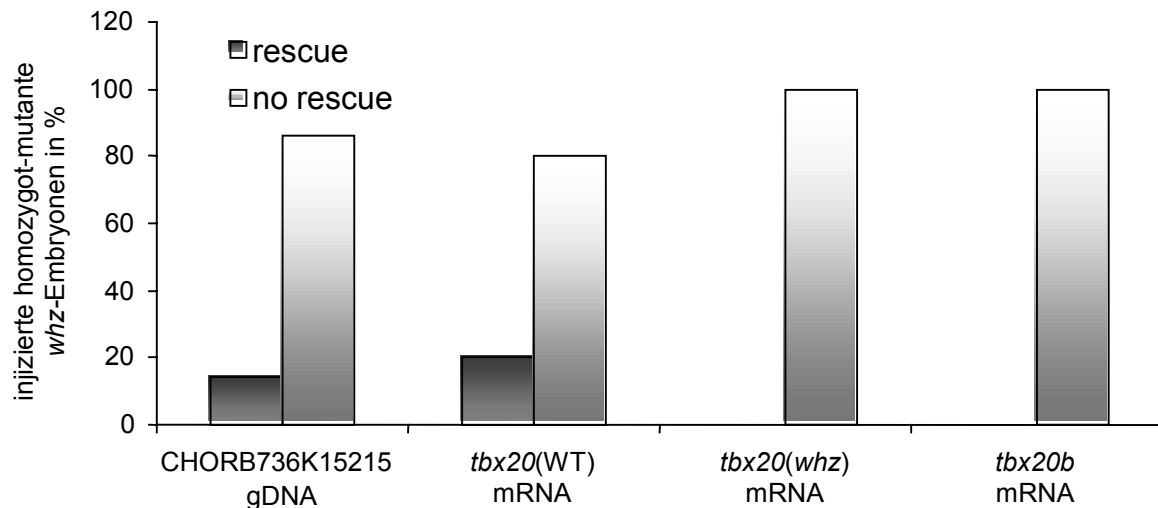


Abb. 31 Wiederherstellung der Herzmorphologie (*rescue*) in mutanten *whz*-Embryonen durch die Expression von WT-*tbx20* in Form von genomischer DNA (BAC CHORB736K1521515) und mRNA. Wie erwartet ist dies durch die Expression von *whz-tbx20* bzw. *tbx20b* nicht möglich.

Als Kontrollexperiment werden 10-100 pg *whz-tbx20*-mRNA mit integriertem Serin und 10-100 pg *tbx20b*-mRNA in mutante und heterozygote *whz*-Embryonen injiziert. Hierbei werden weder kardiale Überexpressionsphänotypen erzeugt, noch kann die Ausprägung des *whz*-Phänotyps in mutanten *whz*-Embryonen verhindert werden (Abb. 31).

Dies zeigt zum einen, dass der Verlust der Tbx20-Funktion in *whz* durch die transiente Expression von *tbx20* kompensiert werden kann und zum anderen, dass *tbx20b* nicht in die Herzentwicklung des Zebrafischs eingreift.

Alle mutanten *whz*-Embryonen, die durch die Injektion von CHORB736K1521515-DNA oder *tbx20*-mRNA bis 48 hpf keinen *whz*-Phänotyp

zeigen, sterben dennoch wie die übrigen mutanten *whz*-Embryonen 7-9 dpf aufgrund kardialer Dysfunktion, was für eine weitere kritische Rolle von Tbx20 in der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion nach der embryonalen Herzentwicklung spricht, wie sie auch aufgrund der Expression von *tbx20* in adulten Herzen vermutet wird [5, 84, 97].

5.6 Verlust der transkriptorischen Aktivatorfunktion in *whz*-Tbx20

Der Homologievergleich zu anderen Organismen zeigt, dass die in *whz*-Tbx20 auftretenden Insertionen eine Region zwischen der DNA-bindenden Tbox-Domäne und der transkriptorischen Aktivator-Domäne betreffen, die über alle untersuchten Spezies hinweg konserviert ist (Abb. 28). Neben potentiellen Änderungen in der Tertiärstruktur, insbesondere durch die Insertion des Disulfidbrücken-Bildners Cystein, ergibt die Berechnung der Sekundärstruktur, dass ein hoch konserviertes α -Helix-Motiv von 9 auf 6 Aminosäuren verkürzt wird. Um die Auswirkung dieser Strukturänderung auf die Funktion von Tbx20 zu untersuchen, werden alle bekannten Funktion von *whz*-Tbx20 untersucht: (1) DNA-Bindung, (2) Proteinbindung, (3) Repressor- und (4) Aktivatorfunktion.

Die Analyse der DNA-Bindungskapazität, welche über die mediale Tbox-Domäne erfolgt, wird mittels EMSA (*electro mobility shift analysis*) an den bekannten TBE-Sequenzen durchgeführt. Da weder mit WT-Tbx20, noch mit *whz*-Tbx20 eine reproduzierbare DNA-Bindung gezeigt werden kann, kann an dieser Stelle keine Aussage über die DNA-Bindungskapazität von *whz*-Tbx20 getroffen werden.

Die Protein-Protein-Interaktion von Tbx20, welche über die N-terminale Region von Tbx20 erfolgt, wird durch ein *pull down*-Experiment mit dem bekannten Tbx20-Bindungspartner Nkx2.5 analysiert. Sowohl für WT-Tbx20 als auch für *whz*-Tbx20 werden dabei gleiche Bindungskapazitäten gemessen, was dafür spricht, dass die Protein-Protein-Wechselwirkung von *whz*-Tbx20 durch die Insertionen nicht affektiert ist.

Die transkriptorische Aktivität von Tbx20 wird in Zellkultur mit Hilfe von Luciferase-Experimenten analysiert. Dazu wird die Eigenschaft von Tbx20 untersucht, den *anf*-Promotor in Gegenwart verschiedener Transkriptionsfaktoren differentiell zu regulieren.

Die Repressorfunktion von *whz*-Tbx20 wird durch die Koexpression mit Tbx5 untersucht, da Tbx20 die durch Tbx5 induzierte *anf*-Expression reprimiert. Wie WT-

Tbx20 reduziert dabei *whz*-Tbx20 ebenfalls die Luciferase-Aktivität um 75 % (Abb. 32).

Dieses Experiment zeigt, dass *whz*-Tbx20 *in vivo* physikalisch und funktionell u. a. mit Tbx5 interagieren kann und dass die Repressorfunktion uneingeschränkt intakt ist. Zum anderen zeigt dieses Experiment, dass *whz*-Tbx20 nukleär lokalisiert und dass die noch unbekannte Kernlokalisationssequenz durch die Insertionen nicht affektiert ist.

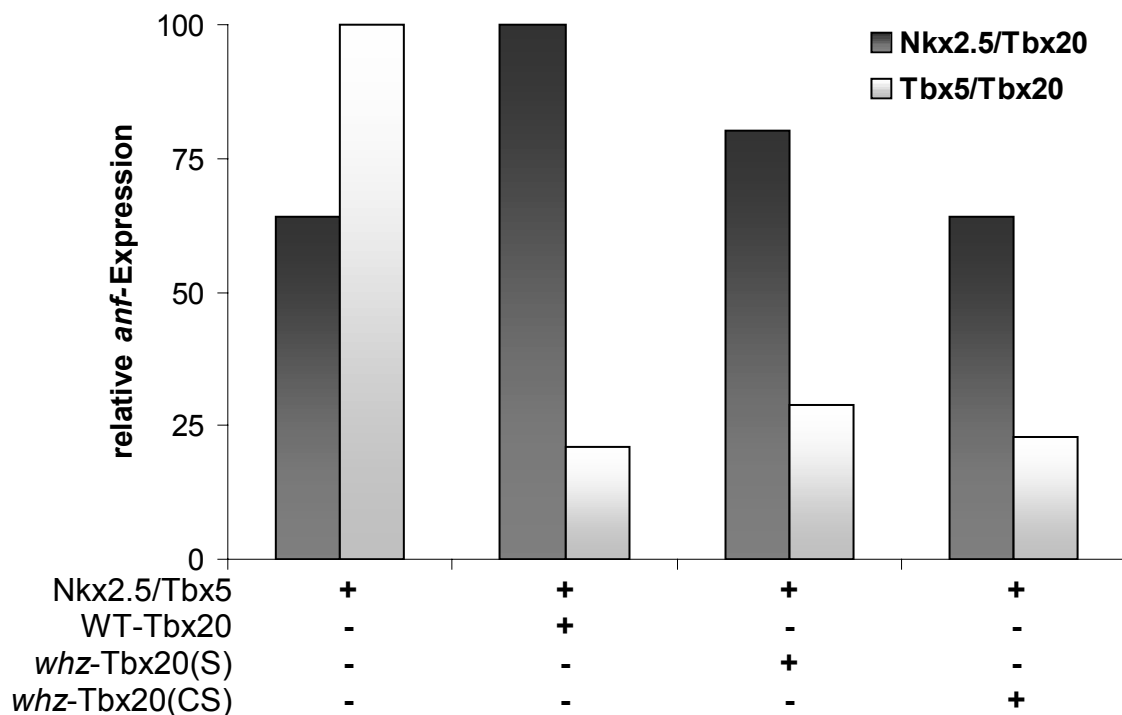


Abb. 32 Transkriptionelle Funktionsanalyse von Tbx20. Während die Repression der Tbx5-induzierten *anf*-Expression durch *whz*-Tbx20 der WT-Kontrolle entspricht, geht die synergistische Aktivator-Funktion mit Nkx2.5 bei *whz*-Tbx20(S) zu 50 % und bei *whz*-Tbx20(CS) zu 100 % verloren.

Die Aktivatorfunktion von Tbx20 wird durch die Koexpression mit Nkx2.5 untersucht, da Tbx20 die durch Nkx2.5 induzierte *anf*-Expression um weitere 33 % verstärken kann. Die Koexpression von Nkx2.5 mit *whz*-Tbx20(S) führt dabei nur zu einer 15 %igen Steigerung der Luciferase-Aktivität, während *whz*-Tbx20(CS) die *anf*-Expression nicht steigern kann (Abb. 32).

Da *whz*-Tbx20 und Nkx2.5 physikalisch interagieren können und die Repressorfunktion von *whz*-Tbx20 intakt ist, zeigt dieses Experiment, dass in *whz* ausschließlich die Aktivatorfunktion von Tbx20 affektiert ist.

5.7 Inhibition der endothelialen AV-Ring-Bildung durch *tbx20*-Knockdown

Das Fehlen der AV-Verzögerung und die Expression von *anf* in der AV-Region mutanter *whz*-Embryonen weisen darauf hin, dass den mutanten *whz*-Embryonen eine elektrisch isolierende Zellschicht zwischen Atrium und Ventrikel fehlt. Da diese endothelialen Ursprungs ist, kann sie durch molekulare Marker des Endothels visualisiert werden. Dazu wird in einer transgenen Zebrafischlinie, die GFP unter Kontrolle des endothelspezifischen *fli1*-Promotors exprimiert, *tbx20* durch *Morpholino antisense-Knockdown* inaktiviert.

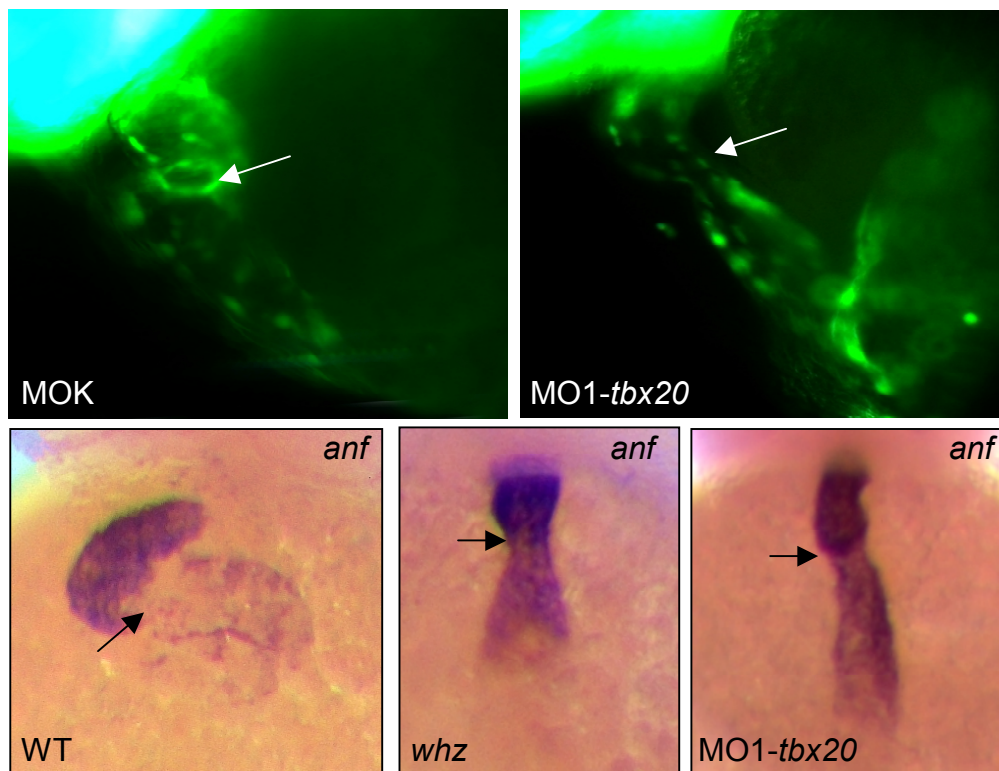


Abb. 33 *tbx20*-Knockdown inhibiert AV-Ring-Bildung. Der *tbx20*-Knockdown inhibiert die Ausbildung des endothelialen AV-Rings (Pfeil) im Zebrafischherz, dargestellt durch fehlende *fli1*-Expression bzw. vorhandene *anf*-Expression in der AV-Region (Pfeil).

Im Gegensatz zu Kontroll-*Morpholino*-(MOK)-injizierten Embryonen, welche zwischen 36 und 48 hpf einen GFP-markierten endothelialen AV-Ring ausbilden, führt der *tbx20*-Knockdown dazu, dass der für die elektrische Isolierung notwendige endotheliale AV-Ring nicht ausgebildet wird (Abb. 33). Die Untersuchung der *anf*-Expression in MO1-*tbx20*-injizierten Embryonen ergibt wie in mutanten *whz*-Embryonen die Expression von *anf* an der AV-Region (Abb. 33).

5.8 Angiogenesedefekte durch *tbx20-Knockdown* im Zebrafisch

tbx20-Knockdown-Embryonen entwickeln nur eine sehr schwache Blutzirkulation. Darüber hinaus kann keine Zirkulation von Blutzellen in intersegmentalen Gefäßen beobachtet werden. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wird mit MO1-*tbx20*-injizierten Embryonen 48 hpf eine Mikroangiographie mit fluoreszenzmarkierten Latexkügelchen durchgeführt. Dabei können zwar die Hauptgefäße (dorsale Aorta und Kardinalvene), nicht aber die intersegmentalen Gefäße dargestellt werden. Um sicherzustellen, dass die fehlende Zirkulation durch die intersegmentalen Gefäße nicht durch den Kollaps der Blutgefäße aufgrund des durch den Herzdefekt verursachten verringerten Blutdrucks zurückzuführen ist, wird MO1-*tbx20* in eine transgene Fischlinie injiziert, die GFP unter Kontrolle des endothelspezifischen *fli1*-Promotors exprimiert, wodurch Vaskulo- und Angiogenese *in vivo* beobachtet werden können.

Während die Vaskulogenese bei den MO1-*tbx20*-injizierten Embryonen normal verläuft, findet die Angiogenese, d.h. das Wachstum kleinerer Gefäße aus den Hauptgefäßen in die Peripherie, nicht statt (Abb. 34). So sind bei MO1-*tbx20*-injizierten Embryonen 24 hpf zwar die Hauptgefäße voll ausgebildet, intersegmentale Gefäße wie bei den MOK-injizierten Embryonen werden hingegen nicht angelegt (Abb. 34). Erst zwischen 36 und 48 hpf bilden sich wenige verkürzte und dysmorphe intersegmentale Gefäße aus, in denen jedoch keine Blutzirkulation beobachtet werden kann.

Um auszuschließen, dass die inhibierte Angiogenese MO1-*tbx20*-injizierter Embryonen auf den frühembryonalen Verlust der Blutzirkulation zurückzuführen ist, wird ein weiteres *Morpholino*, MO-*amhc*, gegen die atrial-spezifische Myosin-schwere-Kette (*amhc*) injiziert, welches die embryonale kardiale Kontraktilität inhibiert und damit den kompletten Verlust jeglicher frühembryonaler Blutzirkulation induziert.

MO-*amhc*-injizierte Embryonen entwickeln zum gleichen Zeitpunkt normale intersegmentale Gefäße wie MOK-injizierte Embryonen (Abb. 34), was zeigt, dass im Zebrafisch spezifisch der Verlust von *tbx20* die Angiogenese inhibiert. Da mutante *whz*-Embryonen keine Angiogenesedefekte aufweisen, kann die in *whz* gestörte transkriptionale Aktivatorfunktion von Tbx20 die Angiogenese im Zebrafisch nicht beeinflussen.

5.9 Tbx20b reguliert die Angiogenese im Zebrafisch

Zur Klärung der Diskrepanz in der Angiogenese zwischen MO1-*tbx20*-injizierten und mutanten *whz*-Embryonen wird ein weiteres *Morpholino* gegen die Splice-Akzeptor-Stelle von Intron 6 von *tbx20* hergestellt (MO2-*tbx20*), was zum Verlust von Exon 7 und zu einer Leserahmenverschiebung führen soll. Die Injektion von 8 pg MO2-*tbx20* in Zebrafischembryonen im 1-4-Zellstadium phänotypiert wie MO1-*tbx20* den kardialen *whz*-Phänotyp.

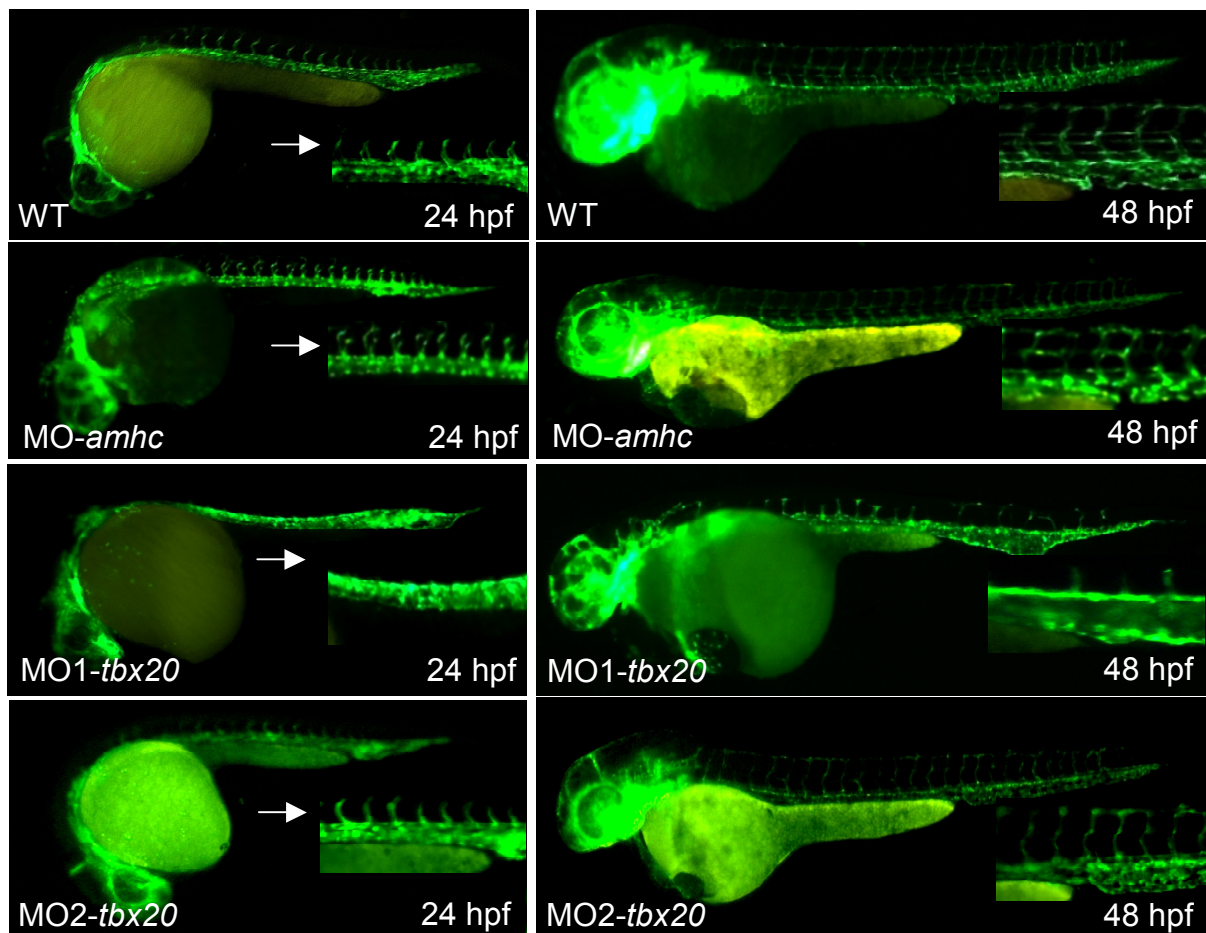


Abb. 34 Untersuchung der Angiogenese in WT-, MO1- und MO2-*tbx20*-injizierten Embryonen. Während bei MO1-*tbx20*-injizierten Embryonen die Angiogenese eindeutig inhibiert ist, bilden MO2-*tbx20* injizierte Embryonen normale intersegmentale Gefäße aus (Pfeil).

Wie bei MOK-injizierten und mutanten *whz*-Embryonen bilden sich jedoch 24 hpf normale intersegmentalen Gefäße aus, die sich bis 72 hpf normal weiterentwickeln (Abb. 34).

Die Sequenzierung der *tbx20*-mRNA aus MO2-*tbx20*-injizierten Embryonen ergibt wie erwartet den vollständigen Verlust von Exon 7 und eine Leserahmenverschiebung, die zu einem frühen Stop direkt nach der DNA-bindenden Tbox-Domäne und dem Verlust der transkriptionalen Regulatorelemente führt. Das

trunkierte Tbx20-Protein entspricht damit funktionell Tbx20b, das keine transkriptionale Regulatorelemente enthält und dessen Funktion bis dahin unbekannt war.

Diese Daten zeigen, dass Tbx20b die Angiogenese des Zebrafischs reguliert, zumal es keine Rolle in der embryonalen Herzentwicklung zu spielen scheint.

5.10 Ungestörte Regulation von *tbx5* in *weiches herz*^{m245}

Wie von Szeto et al. [140] gezeigt werden konnte, wird *tbx5* in *tbx20-Knockdown*-Embryonen stark hochreguliert, was auf eine direkte oder indirekte repressorische Funktion von Tbx20 in der Regulation der *tbx5*-Expression hinweist. Um zu analysieren, ob *tbx5* in mutanten *whz*- und damit *loss of tbx20 function*-Embryonen ebenfalls hochreguliert ist, wird die *tbx5*-Expression mittels ISH und RQ-PCR untersucht.

Die ISH-Analysen mit WT- und mutanten *whz*-Embryonen 24, 36 und 48 hpf zeigen keine Unterschiede in der *tbx5*-Expression im Vergleich zu WT-Embryonen (Abb. 35).



Abb. 35 Quantifizierung von Tbx5 in *whz*. *In situ*-Hybridisierung zeigt die kardiale Expression von *tbx5* in WT- und mutanten *whz*-Embryonen 36 hpf.

Dieses Ergebnis wird durch RQ-PCR mittels Lightcycler mit RNA aus isolierten embryonalen WT- und mutanten *whz*-Herzen und ein cDNA-Microarray-Experiment mit RNA aus ganzen Embryonen im 48 hpf Stadium bestätigt.

Da zwar durch den *tbx20-Knockdown* [140], nicht aber durch den Verlust der Tbx20-Aktivatorodomäne in *whz* die *tbx5*-Expression verstärkt wird (z.B. durch die

fehlende Aktivierung eines *tbx5*-Repressors), muss *tbx5* direkt von Tbx20 reprimiert werden, zumal der Promotor von *tbx5* Tbox-Bindeelemente enthält.

5.11 Normale synergistische Aktivität zwischen Tbx20 und Tbx5 in weiches herz^{m245}

Wie von Brown et al. [24] gezeigt, regulieren Tbx20 und Tbx5 synergistisch die Herzentwicklung im Zebrafisch. Zur Bestätigung dieser These werden geringe Dosen eines *Morpholino antisense*-Oligonukleotids gegen die Start-Stelle von *tbx5* (MO-*tbx5*) in die Nachkommen heterozygoter *whz*-Paare im 1-4-Zell-Stadium injiziert, der Phänotyp analysiert und die Embryonen mit *tbx20*-flankierenden CA-Markern genotypisiert. Für den Fall synergistischer Aktivität beider Transkriptionsfaktoren sollen die heterozygoten *whz*-Embryonen für reduziertes *tbx5* sensitiviert sein, wodurch statistisch mehr heterozygote *whz*- als WT-Embryonen einen pathologischen kardialen oder den *tbx5*-Knockdown-/*whz*-Phänotyp zeigen sollen.

Bei der Injektion von 0,5 pg MO-*tbx5* zeigen 48 hpf 26 % der injizierten Embryonen (n = 121) den *whz*-Phänotyp und weitere 51 % einen leicht pathologischen Herzphänotyp. Der prozentuale Anteil von WT- und heterozygoten *whz*-Embryonen ist bei den Embryonen mit leicht pathologischem Herzphänotyp gleich. Ein heterozygoter Embryo zeigt alle Merkmale eines mutanten *whz*-Embryos, was jedoch auch unter Kontrollbedingungen auftritt und auch in den vorangegangenen Genotypisierungsexperimenten beobachtet wurde.

Bei der Injektion von 2 pg MO-*tbx5* zeigen 48 hpf 63 % der injizierten Embryonen (n = 100) den *whz*- und 37 % den leicht pathologischen Herzphänotyp. Die Genotypisierung der Embryonen mit *whz*-Phänotyp ergibt neben allen mutanten *whz*-Embryonen die gleiche prozentuale Verteilung heterozygoter und WT-Embryonen.

Dieses Experiment zeigt, dass die synergistische Aktivität von Tbx20 und Tbx5 bei der embryonalen Herzentwicklung ausschließlich auf der Repressorfunktion von Tbx20 beruht, die in *whz* nicht affektiert ist und unter anderem die Expression von *anf* reguliert.

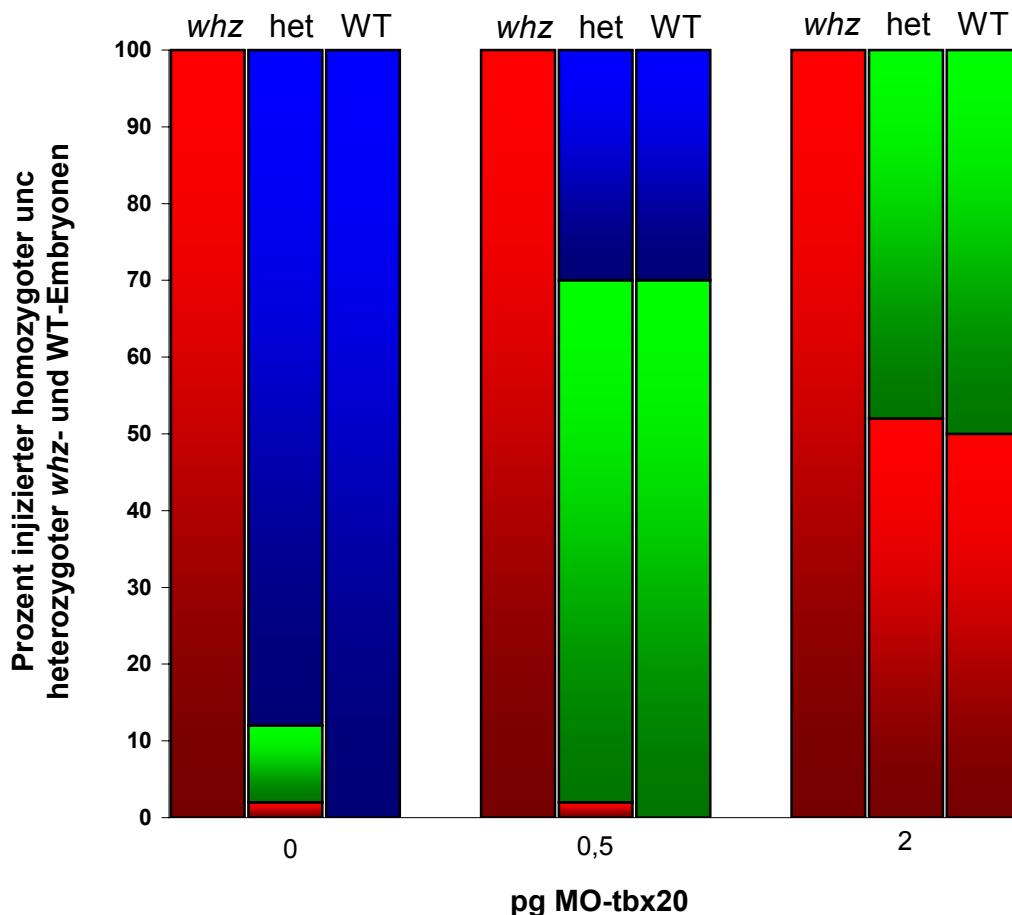


Abb. 35 Synergistische Aktivität von Tbx20 und Tbx5 in *whz*. Heterozygote *whz*-Embryonen (het) sind nicht gegenüber reduziertem Tbx5 sensitiviert, da der Effekt von MO-*tbx5* auf heterozygote *whz*- und WT-Embryonen gleich ist. ■ *whz*-Phänotyp, ■ leicht pathologischer Herzphänotyp, ■ WT-Phänotyp.

5.12 Identifikation neuer Signalwege in der AVC-Entwicklung

Zur Identifikation direkter und indirekter Zielgene des Tbx20-Transkriptionsfaktors und an der AVC-Entwicklung beteiligter Gene wird ein Microarray-Experiment mit einem zebrafischspezifischen cDNA-Chip (MWG-Biotech) durchgeführt, der über 14000 cDNAs und offene Leserahmen enthält, die für etwa 6000 unterschiedliche Gene kodieren.

Die Auswertung des Microarray-Experiments ergibt, dass in den mutanten *whz*-Embryonen 251 Gene um mehr als 200 % hochreguliert und 178 Gene um mehr als 50 % herunterreguliert sind. Tbx20 ist dabei, wie die Quantifizierungsexperimente zuvor prognostizierten, um 80 % hochreguliert, was auf eine kompensatorische Regulation hindeutet.

Auffällig ist außerdem die deutliche Herunterregulation von *bmp2* (-60 %), einem Regulator von *tbx20*, und verschiedener kardial-spezifischer Myosine (-60 %)

und Aktine (-50 %), was auf die verringerte kardiale Masse der *whz*-Herzen zurückzuführen ist. Darüber hinaus sind AVC-spezifische Gene, wie *bmp4* (+200 %) und *tbx2* (+240 %), deutlich hochreguliert, was bereits durch ISH-Analysen gezeigt wurde.

Die myo- und endokardiale Entwicklung des AVC benötigt eine Reihe von Differenzierungs- und Migrationsprozessen von Bindegewebszellen. Deren Verhalten wird u. a. durch die Familie der *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-Gene reguliert, von denen einige kardial exprimiert und durch verschiedene Mitglieder der Tbx- und Bmp-Familien induziert werden [1, 115]. Da dadurch FGF-Gene oder FGF-bindende Gene indirekte Kandidaten für die AVC-Entwicklung sind, wird die Expression dieser Gene untersucht. Dabei wird neben der dramatischen Herunterregulation von *fgf5* (-80 %) auch eine starke Hochregulation verschiedener *fgf*-Rezeptoren, u. a. *fgfr4* (+2000 %), *fop* (+900 %) und *fgfr* und *fibp* (+500 %) festgestellt. Dies spricht für eine entscheidende Rolle dieser Gene in der AVC-Entwicklung im Signalweg von Tbx20.

5.13 Phänokopie von *weiches herz*^{m245} durch *fgf8*-Knockdown

Zur Untersuchung der Rolle FGF-assoziiierter Gene in der embryonalen Herzentwicklung wird *fgf8*, der einzige bekannte herzdefektassoziierte FGF und Ligand von FGFR4, durch *Morpholino antisense-Knockdown* inaktiviert. Dazu wird ein gegen die translationelle Start-Stelle (Start-ATG) von *fgf8* gerichtetes *Morpholino* (MO-*fgf8*, Prof. Michael Brand, MPI Dresden) in WT-Zebrafischembryonen im 1-4-Zellstadium injiziert. Die Injektion von 4 pg MO-*fgf8* induziert dabei starke morphologische und funktionelle Herzdefekte, welche diese von *whz* phänokopieren. Bis 48 hpf findet keine Herzdrehung statt. Zusätzlich sind die Ventrikel stark verkleinert, die AV-Übergänge diffus und die Kontraktionen von Atrium und Ventrikel peristaltisch. Dieses weist auf eine entscheidende Rolle von FGF8 in der Entwicklung des AVC hin.

5.14 Funktionelle AVC-Defekte durch Inhibierung des FGF-Signalwegs

Um die Rolle des FGF-Signalwegs in der Entwicklung des AVC weiter zu untersuchen, werden Zebrafischembryonen nach der kardialen Fusion mit dem FGFR-Inhibitor SU5402 (Juan-Ramon Martinez-Morales, EMBL, Heidelberg) behandelt. Dazu werden WT-Zebrafischembryonen zwischen 24 hpf und 72 hpf in

4 µg/mL SU5402 inkubiert und die Herzfunktion *in vivo* beobachtet. Ab 36 hpf kann bei allen Embryonen der komplette Verlust der Blutzirkulation festgestellt werden. Obwohl die Herzen der behandelten Embryonen in ihrer Morphologie normal entwickelt erscheinen, ist die ventrikuläre Kontraktilität stark reduziert. Außerdem kontrahieren Atrium und Ventrikel nicht sequentiell, sondern wie in mutanten *whz*-Embryonen peristaltisch. Darüber hinaus zeigt SU5402 eine negativ chronotrope Wirkung und bewirkt bei 2 von 9 Embryonen die Umkehr der peristaltischen Kontraktion, nun ausgehend vom *Bulbus arteriosus*. Diese Daten zeigen erstmals, dass der FGF-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des AV-Überleitungssystems und auch des Sinusknotens hat.

Da die Expression verschiedener FGFR in mutanten *whz*-Embryonen stark erhöht ist, besteht die Möglichkeit, dies durch eine leichte Inhibierung des FGF-Signalweges auszugleichen und die Ausprägung des *whz*-Phänotyps zu verhindern. Dazu werden mutante *whz*-Embryonen zwischen 24 und 72 hpf in 0,5 - 4 µg/mL SU5402 aufgezogen. Durch die suboptimalen Dosen von SU5402 kann jedoch bei keinem der mutanten *whz*-Embryonen die Ausprägung des *whz*-Phänotyps verhindert werden. Dies lässt vermuten, dass die verstärkte Expression FGF-bindender Proteine eine kompensatorische *Feedback*-Reaktion auf die fehlende Stimulation durch Liganden ist.

5.15 Keine negativ inotropen Effekte durch SU5402 in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Aufgrund der stark reduzierten ventrikulären Kontraktilität in SU5402-behandelten Zebrafischembryonen wird der inotrope Einfluss des FGFR-Inhibitors auf Kardiomyozyten untersucht. Dazu werden frisch isolierte und noch kontrahierende neonatale Rattenkardiomyozyten mit 2-8 µg/mL SU5402 behandelt und über einen Zeitraum von 3 h beobachtet. Bei keiner der eingesetzten Konzentrationen wird dabei ein Effekt auf die Inotropie der neonatalen Kardiomyozyten festgestellt, was darauf schließen lässt, dass im Zebrafisch beobachtete geringere Kontraktilität sekundäre Ursachen hat.

6 Diskussion

6.1 *Weiches herz*^{m245} kodiert für *tbx20*

Im Rahmen der funktionellen Genomanalyse wurden durch ENU-Mutagenese Zebrafischmutanten mit Defekten des Herz-Kreislaufsystems erzeugt [39, 54]. Diese ermöglichen eine Charakterisierung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und Signalwege und können mit wenigen Einschränkungen auf den Menschen übertragen werden, um humanen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems entgegenzuwirken.

Diese Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung der ENU-induzierten rezessiven Zebrafisch-Herzfunktions-Mutante *weiches herz*^{m245} (*whz*) und der Identifizierung des verantwortlichen Gens.

Die Isolierung des in *whz* affizierten Genlocus erfolgte durch positionelle Klonierung. Dazu wurde mit Hilfe einer auf Mikrosatelliten-Markern basierenden genetischen Karte des Zebrafischgenoms, von BAC- und YAC-Walks und durch die Analyse von 3500 mutanten *whz*-Embryonen das *whz*-Intervall auf ein 90 kb-Intervall auf *linkage group* 16 mit den Genen *tbx20* und *zgc:56020* eingeengt. Zwar wurde für beide Gene eine kardiale Expression während der embryonalen Herzentwicklung nachgewiesen, aber ausschließlich der *Morpholino antisense-Knockdown* von *tbx20* konnte den kardialen *whz*-Phänotyp kopieren.

Die Sequenzierung von *tbx20*-mRNA aus homozygot-mutanten *whz*-Embryonen ergab bei 17 von 20 *tbx20*-Klonen die Insertion von 3 bzw. 6 Nukleotiden, die zur Integration einer bzw. zweier Aminosäuren, Serin (S) bzw. Cystein-Serin (CS), führt. Da diese Insertionen durch alternatives Splicen von Intron 6 erzeugt werden, wurden alle bekannten für den Splicevorgang erforderlichen Erkennungssequenzen des Introns sequenziert. Diese Sequenzanalysen zeigten, dass in mutanten *whz*-Embryonen die potentielle *branching point*-Erkennungssequenz (B₋₆₆) von Intron 6 durch eine C→T-Punktmutation (-66 bp) verändert ist. Da durch eine solche Veränderung alternatives Splicen induziert werden kann [79, 108], ist die C→T-Mutation an dieser Stelle als ursächlich für die Insertionen in *whz-tbx20* anzusehen. Da Norton et al. [108] bei Defekten der *branching point*-Erkennungssequenz außerdem reduzierte Spliceaktivitäten beobachtet haben, wurde der Splicevorgang an Intron 6 quantitativ untersucht, wobei jedoch nur eine geringe Reduktion der Spliceaktivität (-27 %) festgestellt wurde.

Die *whz*-Insertionen treten in einer konservierten Region von *tbx20* zwischen der DNA-bindenden Tbox-Domäne und der transkriptionalen Aktivator-domäne auf und bewirken die Verkürzung eines konservierten Helixmotivs, welches im WT den Beginn der transkriptionalen Aktivator-Domäne von Tbx20 darstellt. Darüber hinaus kann die Insertion eines Cysteins die Tertiärstruktur des Tbx20-Proteins stark verändern, indem es mit weiteren Cystein-Resten des Proteins Disulfidbrücken bildet. Dies kann zu dramatischen Veränderungen in der Proteinstruktur und -funktion führen. Um die Auswirkungen dieser Strukturveränderungen durch die *whz*-Insertionen zu analysieren, wurden in Kooperation mit einem auf *tbox*-Gene spezialisierten Labor (Labor Prof. Harvey, The Victor Chang Cardiac Research Institute, Darlinghurst, NSW, Australien) verschiedene Funktionsanalysen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass in *whz* trotz intakter Protein-Protein-Wechselwirkung von Tbx20 mit Nkx2.5 die synergistische transkriptionale Aktivatorfunktion beider Transkriptionsfaktoren gestört ist. Die transkriptionale Repressorfunktion von *whz*-Tbx20 ist dagegen nicht affiziert, was die Repressorwirkung am *anf*-Promotor durch *whz*-Tbx20 in Gegenwart von Tbx5 zeigte. Die alleinige transkriptionale Aktivatorfunktion und die DNA-Bindekapazität von *whz*-Tbx20 konnte aufgrund noch unbekannter Zielsequenzen nicht analysiert werden.

Diese Daten belegen, dass die in *whz-tbx20* identifizierten Splice-Mutationen und der damit verbundene partielle Verlust der transkriptionalen Aktivatorfunktion im homozygoten Zustand den kardialen *whz*-Phänotyp auslösen.

Darüber hinaus zeigte der Vergleich des kardialen Phänotyps von *whz* mit dem des *Morpholino antisense-Knockdowns* von *tbx20*, dass der partielle Verlust der transkriptionalen Aktivatorfunktion von Tbx20 in *whz*, obwohl noch geringe Mengen WT-*tbx20* exprimiert werden, einem für die Herzentwicklung funktionellen *tbx20-Knockout* gleichzusetzen ist. Den Beweis dafür lieferte ein Experiment, in dem es durch die Expression von WT-*tbx20* in mutanten *whz*-Embryonen gelang, die Ausprägung des kardialen *whz*-Phänotyps zu verhindern (sog. genetischer *rescue*). Da durch die Expression von *whz-tbx20* und einer zweiten isolierten Isoform von *tbx20*, *tbx20b*, die keine transkriptionalen Regulatorelemente enthält, kein genetischer *rescue* von *whz* möglich war, wurde gezeigt, dass die Herzentwicklung im Zebrafisch zumindest von der funktionell intakten Aktivator-domäne von Tbx20 abhängt.

Um zum einen die Rolle von Tbx20, seiner funktionellen Domänen und Isoformen in der embryonalen Zebrafischentwicklung und zum anderen die embryonale Herzentwicklung selbst zu untersuchen, wurden mutante *whz*- und *tbx20-Knockdown*-Embryonen mit molekularbiologischen und histologischen Methoden untersucht.

Das Ergebnis dieser Analysen war, dass durch den Verlust der Tbx20-Funktion Zebrafischherzen sowohl morphologisch, als auch funktionell stark affektiert sind. Ein charakteristisches Merkmal phänotypisch mutanter *whz*-Embryonen ist, dass die Entwicklung des atrioventrikulären Kanals (AVC) in einem sehr frühen Stadium gestört wird.

6.2 Normale kardiale Fusion in *weiches herz*^{m245}

Die Herzentwicklung mutanter *whz*-Embryonen verläuft bis 24 hpf normal. Ebenso wie in WT-Embryonen und bei *tbx20-Knockout*-Embryonen in der Maus [129, 138, 141] fusioniert das normal bilateral angelegte Herzfeld zu einem peristaltisch kontrahierenden Herzschauch, der aus einer inneren Endokardschicht und einer äußeren Myokardschicht besteht [50, 94, 132, 146, 152, 159].

Die Fusion der zwei Herzfelder ist u. a. von dem Tbx20-Interaktionspartner Gata5 abhängig [117], der während der gesamten embryonalen Herzentwicklung mit Tbx20 koexprimiert wird [118, 119, 152]. Um zu untersuchen, ob eine gestörte synergistische Funktion beider Gene den kardialen *whz*-Phänotyp auslöst, wurde der publizierte *gata5-Knockout*- [117, 118, 147] mit dem eigenen *tbx20*-Phänotypen verglichen.

So führt der Verlust der Gata5-Funktion im Zebrafisch zu stark reduziertem ventrikulärem Gewebe und zur *Cardia bifida*, d.h. der Ausbildung zweier getrennter Herzanlagen aufgrund fehlender Verschmelzung der Herzfelder [117]. Darüber hinaus spielt Gata5 durch die Regulation von *nkx2.5* eine wichtige Rolle bei der Differenzierung endo- und myokardialer Zellen [118, 119, 147]. Dass dies auch durch die transkriptionale Regulation von *bmp4* und verschiedener Mitglieder der FGF-Familie erfolgt, zeigt die Tatsache, dass durch *gata5-Knockout*-induzierte Differenzierungsstörungen des Myo- und Endokards durch die Überexpression von *eFGF* und *bmp4* kompensiert werden können [118, 147, 152].

Wie beim *gata5-Knockout* ist in mutanten *whz*-Embryonen das ventrikuläre Gewebe stark reduziert - Zellzählungen ergaben um zwei Drittel reduzierte

ventrikuläre Kardiomyozytenzahlen - eine *Cardia bifida* wurde jedoch nie beobachtet. Dennoch wurden in mutanten *whz*-Embryonen Hinweise auf eine gestörte Kardiomyozytenassemblierung während der kardialen Fusion gefunden. Während in WT-Embryonen nach der kardialen Fusion die ventrikulären und atrialen Kardiomyozytenpopulationen streng voneinander abgegrenzt sind [29, 35, 62, 130, 152], wurde bei mutanten *whz*-Embryonen eine Durchmischung dieser Zellpopulationen beobachtet. Besonders bei mutanten *whz*-Embryonen 24 und 36 hpf konnte im Atrium die Koexpression atrialer Gene mit Ventrikel-spezifischen Genen, z.B. der *ventricular myosin heavy chain* (*vmhc*) beobachtet werden. Die Ursache für dieses Phänomen ist bisher unklar, könnte aber auf eine fehlerhafte Assemblierung der Kardiomyozytenpopulationen - möglicherweise aufgrund gestörter Interaktion von Gata5 mit Tbx20 - zurückzuführen sein, zumal eine Migration von Kardiomyozyten über die AV-Region hinweg nicht beobachtet wurde.

Des Weiteren wird an der AV-Region, wo im WT *tbx20* und *gata5* koexprimiert werden, in mutanten *whz*-Embryonen kein *bmp4* induziert. Da Gata5 über bisher unbekannte Mechanismen *bmp4* induziert [118], physikalisch mit Tbx20 interagiert [137] und durch Verlust der transkriptorischen Aktivatorfunktion in *whz*-Tbx20 am AVC kein *bmp4* induziert wird, ist davon auszugehen, dass *bmp4* im WT durch die synergistische Aktivatoraktivität von Gata5 und Tbx20 induziert wird und damit ein direktes Zielgen von Tbx20 ist.

6.3 Regulation der Herzentwicklung durch Tbx20 und Nkx2.5

Die Differenzierung der Kardiomyozyten und Entwicklung des Herzens nach der kardialen Fusion ist u. a. von dem Homeobox-Gen *nkx2.5* abhängig [94], welches ebenfalls ein wichtiger Interaktionspartner von Tbx20 ist und in der embryonalen Herzentwicklung mit *tbx20* koexprimiert wird [16, 137, 143, 152]. Der Verlust der Nkx2.5-Funktion führt in der Maus zu einem Entwicklungsstop in der Herzentwicklung direkt nach der kardialen Fusion [16, 29, 53, 140, 144], da dadurch der *myocyte enhancer factor 2C* (*mef2c*) nicht induziert wird, der zusammen mit Nkx2.5, Bmp4 und Gata4 die embryonale Herzentwicklung reguliert [71, 130]. Darüber hinaus sind in der Maus und beim Menschen verschiedene Mutationen von *nkx2.5* bekannt, die dominante kardiale Entwicklungsstörungen induzieren. So führen heterozygote Mutation der DNA-Bindedomäne von Nkx2.5 zu Signalweiterleitungsstörungen und AV-Blöcken [16, 72, 125]. Der alleinige *Knockdown* oder *Knockout* von *nkx2.5* im

Zebrafisch hat jedoch weder im homozygoten noch heterozygoten Zustand Einfluss auf die Herzentwicklung, was für kompensatorische Regulationsmechanismen durch andere Homeobox-Gene, wie *nkx2.3* oder *nkx2.7*, im phylogenetischen Zweig des Zebrafischs spricht.

Der kardiale Phänotyp mutanter *whz*-Embryonen zeichnet sich, wie der *nkx2.5*- bzw. *tbx20-Knockout*-Phänotyp der Maus [129], durch einen scheinbaren Entwicklungs- und Differenzierungsstopp nach der kardialen Fusion aus. So findet kein Herzlooping, keine klare Separierung von Atrium und Ventrikel und kein Wechsel von peristaltischer zu sequentieller Kontraktion statt. Zusätzlich zeigte die langsame wellenförmige Ausbreitung der Kontraktionen innerhalb der Herzkammern in *whz* eine sehr unreife Zell-zu-Zell-Signalweiterleitung, wie sie in ausgereifteren Herzen nicht mehr vorkommt [100]. Die fehlende Reife der *whz*-Kammerkardiomyozyten wurde auch durch die transmyokardiale Expression von *versican* und *gata5* gezeigt, die im WT ausschließlich von AV- und unreifen Kammerkardiomyozyten bis 42 hpf exprimiert werden [152].

Darüber hinaus zeigten 25 % der heterozygoten *whz*-Embryonen, wie ebenfalls bei heterozygoten *nkx2.5*-Mutationen in Mensch und Maus beobachtet [16, 72, 125], Defizite in der AV-Überleitung, die durch AV-Blöcke 2. und 3. Grades charakterisiert sind.

Diese Daten weisen auf eine wichtige kooperative Rolle von Nkx2.5 und Tbx20 in der embryonalen Herzentwicklung und, wie im Folgenden beschrieben, der Entwicklung des AVC hin. Dies wurde bereits aufgrund der synergistischen transkriptionellen Aktivität beider Gene u. a. bei der Aktivierung des Promotors von *anf* vermutet [14, 53], das über verschiedene Mechanismen Wachstum und Proliferation reifer Kardiomyozyten reguliert [53, 59, 102, 141]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist genau diese synergistische transkriptionelle Aktivität von Nkx2.5 und Tbx20 durch die *whz*-Insertionen gestört, was in *whz*, sowie beim *nkx2.5-Knockdown* der Maus [16, 29], die Herzentwicklung inhibiert.

6.4 Tbx20 initiiert die Entwicklung des atrioventrikulären Kanals

Die Entwicklung des AVC und der AV-Klappen, die in *whz* gestört ist, hängt von vielen Faktoren ab. Sie setzt voraus, dass eine mediale Region des initialen Herzschlauchs als AV-Region definiert wird, was während oder direkt nach der

kardialen Fusion erfolgt. Anschließend bilden sich unabhängig voneinander erst ein spezialisiertes Signalüberleitungssystem und dann AV-Klappen aus [15].

Die Markierung einer Herz-Region als AV-Region kann durch die spezifische Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren wie *bmp4* verfolgt werden, die lokal durch gezielte Eingriffe in Proliferations- und Transdifferenzierungsprozesse von Kardiomyozyten die Formation des AVC-Myokards und -Endokards induzieren [19, 32, 36, 56, 70, 74, 91, 139].

Die Expression von *bmp4* ist der früheste bekannte molekulare Marker der AV-Region und der *bmp4-Knockout* in der Maus stört während der embryonalen Herzentwicklung u. a. die Ausbildung des AVC und das Herzlooping [20, 70, 74].

Um zu untersuchen, ob in mutanten *whz*-Embryonen eine Herzregion als AV-Region definiert wird, wurde das Expressionsmuster von *bmp4* analysiert. Dabei wurde im Gegensatz zu WT- in *whz*-Embryonen das völlige Fehlen von *bmp4*-Expression im Bereich der AV-Region beobachtet. Dies bewirkt, dass wie beim *bmp4-Knockout* in Maus und *Xenopus* [20, 74, 91] in mutanten *whz*-Embryonen kein Herzlooping und keine Einschnürung zwischen Atrium und Ventrikel durch lokale asymmetrische Proliferation der AV-Kardiomyozyten stattfindet. Im Gegensatz zum *whz*-Phänotyp findet in der Maus jedoch eine normale Entwicklung der sog. endokardialen *cushions*, transienten Strukturen, die aus zur AV-Region migrierenden und dort proliferierenden Endokardzellen bestehen, und der Herzklappen statt. Die fehlende *bmp4*-Expression an der AV-Grenze mutanter *whz*-Embryonen lässt vermuten, dass Tbx20 normalerweise die initiale myokardiale Definition der AV-Region reguliert, was entweder durch die Induktion von *bmp4* erfolgt oder durch *bmp4*-Expression verfolgt werden kann. Dass zusätzlich auch die endokardiale Entwicklung des AVC in *whz* inhibiert wird, weist darauf hin, dass im WT neben *bmp4* noch weitere Gene durch Tbx20 induziert werden müssen, die die Entwicklung des AVC-Endokards regulieren.

Interessanterweise induziert der *Morpholino antisense-Knockdown* von *bmp4* im Zebrafisch keine erkennbaren Defekte der AVC- oder Herzentwicklung. Dieses weist auf kompensatorische Regulationsmechanismen durch andere Mitglieder der BMP-Familie im phylogenetischen Zweig des Zebrafischs hin, welche in *whz* und durch den *tbx20-Knockout* ebenfalls affektiert sein müssen.

Um die Entwicklung der AV-Region in mutanten *whz*-Embryonen im Detail zu untersuchen und weitere Zielgene von Tbx20 zu identifizieren, wurden die

Expressionsmuster von *anf* sowie AVC-spezifischer Gene, wie *tbx2*, *gata5*, *versican* und *notch1b*, untersucht.

Die fehlende Initialisierung der AVC-Entwicklung in *whz*, die im WT durch die Expression von *bmp4* verfolgt werden kann, hätte bedeuten können, dass Gene, die für die weitere AVC-Entwicklung notwendig sind, ebenfalls nicht induziert werden. Anders als erwartet ergaben die Expressionsanalysen von *tbx2*, *gata5*, *versican* und *notch1b*, die im WT nach der Induktion von *bmp4* an der AV-Region regional begrenzt induziert werden, in mutanten *whz*-Embryonen eine gesteigerte und gleichmäßig transkardiale Expression dieser Gene, was beim *tbx20-Knockout* in der Maus auch für *tbx2* beschrieben wird [27, 129, 138].

Die Folgen der transkardialen Expression dieser Gene, besonders die von *tbx2*, kann einzelne Aspekte des kardialen *whz*-Phänotyps erklären:

Die transmyokardiale Überexpression von *tbx2* im Zebrafisch inhibiert die Reifung der Kardiomyozyten zu kontraktile Kammerkardiomyozyten und deren Proliferation durch die Repression verschiedener Zellzyklusgene, wie *anf*, *n-myc* und *cyclinA2* [53, 56, 90]. Das Ergebnis sind stark verkleinerte Herzen, deren rudimentär ausgebildete Herzkammern an einen unterentwickelten Herzschlauch erinnern [27, 28, 36, 56, 73, 90, 110, 112, 121].

Zwar wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sich in mutanten *whz*-Embryonen kontrahierende atriale und ventrikuläre Herzkammern ausbilden, eine Ausreifung in Kammerkardiomyozyten scheint jedoch nicht ausreichend stattzufinden. Dies wird durch die Koexpression AVC-spezifischer Gene, wie *versican* und *gata5*, die nur von AV- und unreifen Kammerkardiomyozyten exprimiert werden, mit dem kammerkardiomyozytenspezifischen *anf*, sowie durch partielle Koexpression kammerspezifischer Gene wie *amhc* und *vmhc* deutlich. Die transmyokardiale Expression von *tbx2* könnte zusätzlich auch die Ursache für die verringerte ventrikuläre Proliferation und die unreife und langsame Erregungsleitung innerhalb beider Herzkammern sein.

Dies weist auf gestörte Entwicklung eines Erregungsleitungssystems innerhalb der Kammern hin, dessen Ausbildung in der Maus u. a. von den Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und Tbx2 abhängt, deren Expressionsmuster bzw. Funktion in *whz* gestört ist [36, 125].

Die fehlende Verstärkung der *tbx2*-Expression in der AV-Region von *whz*-Embryonen ist auch die Ursache für die fehlende Repression von *anf* an dieser

Stelle. Die Folge ist die fehlerhafte Ausbildung des AV-Überleitungssystems, das im WT eine sequentielle Kontraktion von Atrium und Ventrikel erzeugt [34, 36, 53, 59] und durch reduzierte *anf*-Expression dargestellt werden kann.

Das Fehlen des isolierenden AV-Rings in mutanten *whz*-Embryonen wurde in dieser Arbeit durch die Expression von *anf* in der AV-Region und durch den *tbx20-Knockdown* in einer transgenen Fischlinie demonstriert, die GFP unter Kontrolle des Endothel-spezifischen *fli1*-Promotors exprimiert. Während Kontroll-*Morpholino*-injizierte WT-Embryonen zwischen 36 und 48 hpf einen Ring aus endothelialen Zellen zwischen Atrium und Ventrikel entwickelten, fand dies beim *tbx20-Knockdown* nicht statt. Wie in mutanten *whz*-Embryonen wird in diesen Embryonen daher ein weder morphologisch noch funktionell intakter AVC gebildet, der keine sequentielle, sondern peristaltische Kontraktionen von Atrium und Ventrikel bewirkt. Dies wurde auch dadurch gezeigt, dass durch Ca^{2+} -Kanal-Blockade, die im WT die AV-Überleitung stört, in mutanten *whz*-Embryonen keine negativ dromotropen Effekte induziert werden können.

Die AV-Klappen bilden sich aus endokardialen *cushion*-Zellen, die durch endothelial-zu-mesenchymale Transformationen (EMT) transdifferenzieren und in die extrazelluläre Matrix zwischen Endokard und Myokard einwandern [13, 15, 47, 86, 87, 106, 133]. Eine essentielle Voraussetzung für diesen Prozess, der unabhängig von der Bildung des endothelialen AV-Ringes ist, ist die Markierung einer Herzregion als AV-Region und die Präsenz hämodynamischer Scherkräfte im Herzen [13, 61]. Die Spezifizierung der AV-Region als solche hat jedoch bei mutanten *whz*-Embryonen nicht adäquat stattgefunden und Gene, welche in WT-Embryonen die AV-Region definieren, wie *tbx2*, *versican* und *bmp4*, sind, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, nicht spezifisch an der AV-Region exprimiert. Da aber dennoch hämodynamische Scherkräfte in mutanten *whz*-Herzen auftreten, werden Gene, wie *gata5* und *notch1b*, induziert, die für die endokardiale Entwicklung, also für EMT bzw. Herzklappenbildung, benötigt werden. Da jedoch in mutanten *whz*-Embryonen keine Herzregion als AV-Region festgelegt ist, findet die Induktion dieser myokardialen AVC-Gene nicht lokal begrenzt am AVC, sondern transkardial statt.

Weshalb in mutanten *whz*-Embryonen im Gegensatz zu WT-Embryonen, in denen *notch1b* transendokardial überexprimiert wird, die Notch1b-Aktivität bei der Verstärkung der EMT und Herzklappenbildung nicht auf den AVC beschränkt bleibt [15], ist bislang unklar. Ein wichtiger Faktor bei der Begrenzung der Notch1b-Aktivität

scheint jedoch *Bmp4* zu sein. Ein wichtiges Indiz dafür ist, dass *bmp4* im WT mit *notch1b* koexprimiert wird und dass in *whz* nur die Herzregionen EMT-Aktivität zeigten (Klappenrudimente ausbilden), die *notch1b* und *bmp4* koexprimieren.

6.5 Aktivator- und Repressorfunktion von Tbx20 essentiell für AVC-Entwicklung im Zebrafisch

Die in *whz* beobachteten Defekte des AV-Überleitungssystems können auch auf eine Dysregulation oder einen partiellen synergistischen Funktionsverlust von Tbx5 zurückzuführen sein, das physikalisch mit Tbx20 interagiert [24, 112, 142] und möglicherweise durch Tbx20 reguliert wird [99, 111, 140]. So sind AV-Septumdefekte und AV-Überleitungsstörungen beim Menschen mit Mutationen in Tbx5 assoziiert (Holt-Oram-Syndrom) und der *tbx5-Knockout*-Phänotyp beim Zebrafisch ist dem von *whz* ähnlich [24, 46, 140]. Darüber hinaus kann Tbx5 den *anf*-Promotor aktivieren, was durch Tbx20 inhibiert wird. In embryonalen WT-Herzen wird *tbx5* transmyokardial exprimiert, wobei die Expression an der AV-Grenze deutlich verstärkt ist [92, 111, 112, 122, 142].

Expressionsanalysen von *tbx5* in mutanten *whz*-Embryonen zwischen 24 und 48 hpf zeigten in der vorliegenden Arbeit keine Expressionsunterschiede im Vergleich zum WT mit der Einschränkung, dass in *whz* an der AV-Grenze keine stärkere Expression zu erkennen war als im umgebenden Kammermyokard. Das Ergebnis wurde durch eine herzspezifische RNA-Quantifizierung mittels *Real time-PCR* und einen cDNA-Microarray bestätigt. Diese Ergebnisse belegen die Ergebnisse von Brown et al. [24] und Takeuchi et al. [141], welche keine Regulation von *tbx5* in *tbx20-Knockout*-Mäusen beobachtet haben bzw. eine Autoregulation von *tbx5* postulieren [103, 111, 112]. Da jedoch Szeto et al. [140] und McCallum et al. [99] eindeutig eine Verstärkung der *tbx5*-Expression durch *tbx20-Knockdown* erzeugt haben, muss *tbx5* direkt durch die Repressordomäne von Tbx20 reguliert werden, die in *whz* nicht affektiert ist. Dies konnte in diesem Experiment jedoch nicht untersucht werden, da in *whz* ausschließlich die Aktivator-domäne von Tbx20 affektiert und die Repressorfunktion voll intakt ist.

Da die kooperative transkriptorische Aktivität von Tbx20 und Tbx5 intakt ist, wurde untersucht, ob diese für die Entwicklung des AVC erforderlich ist. Dazu wurden, in Anlehnung an die Experimente von Brown et al. [24], geringe und suboptimale Dosen des *tbx5-Morpholinos* in die Nachkommen heterozygoter *whz*-

Fische injiziert, wodurch bei 51 % der injizierten Embryonen ein leicht pathologischer kardialer Phänotyp induziert werden konnte, der sich durch eine langsame Ausbreitung der Erregung, langsame Blutzirkulation, Perikardödeme und/oder AV-Blöcke auszeichnete. Da die prozentuale Verteilung von heterozygoten *whz*- und WT-Embryonen bei diesen Embryonen gleich war, sind die heterozygoten *whz*- und damit partiell *tbx20*-defizienten Embryonen nicht für reduzierte *tbx5*-Expression sensitiviert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aktivatorfunktion von Tbx20 keine Rolle bei der synergistischen Aktivität von Tbx20 mit Tbx5 spielt. Da aber durch den *tbx5*-*Knockdown* *whz*-ähnliche AVC-Defekte in WT- und heterozygoten *whz*-Embryonen erzeugt wurden, muss Tbx5 und damit auch die in *whz* intakte und mit Tbx5 synergistisch wirkende Repressorfunktion von Tbx20 an der AVC-Entwicklung beteiligt sein.

6.6 Regulation der Angiogenese im Zebrafisch durch Tbx20b

In einem weiteren Experiment der vorliegenden Arbeit wurde in WT- und *whz*-Embryonen eine zweite Funktion von Tbx20 in der Angiogenese des Zebrafischs entdeckt und funktionell Tbx20b zugeordnet, einer verkürzten Isoform von Tbx20, der alle transkriptionalen Regulatorelemente fehlen. Dazu führte die Beobachtung, dass im Gegensatz zu mutanten *whz*-Embryonen *tbx20*-*Knockdown*-Embryonen (MO1-*tbx20*) keine bzw. stark verkürzte intersegmentale Gefäße ausbildeten. Dies demonstriert eine wichtige Rolle von Tbx20 in der Angiogenese des Zebrafischs, welche zuvor schon von Szeto et al. [140] postuliert und aufgrund der transienten Expression von *tbx20* in den Hauptgefäßen vermutet wurde.

Da mutante *whz*-Embryonen, wie angiographisch gezeigt, keine Angiogenese-Defekte aufweisen, kann der Verlust der transkriptionalen Aktivatorfunktion von Tbx20 die Angiogenese nicht beeinflussen. Um dieses zu bestätigen und weiterführend zu untersuchen, wurde ein *Morpholino antisense*-Oligonukleotid gegen die Splice-Akzeptorstelle von Intron 6 hergestellt (MO2-*tbx20*), welches zum kompletten Verlust von Exon 7, zur Verschiebung des Leserahmens und damit zu einem frühen Stop direkt nach DNA-bindenden Tbox-Domäne führt. Damit entsprach das trunkierte Protein funktionell Tbx20b, dessen Funktion bis dahin unbekannt war. Die Injektion von MO2-*tbx20* induzierte wie die von MO1-*tbx20* den kardialen *whz*-Phänotyp. Im Gegensatz dazu entwickelten die MO2-*tbx20*-injizierten Embryonen

jedoch normale intersegmentale Gefäße vergleichbar mit WT- und mutanten *whz*-Embryonen.

Dieses Experiment zeigte, dass die transkriptionalen Regulatorelemente von Tbx20 für die AVC-Entwicklung im Zebrafisch benötigt werden. Dies spricht für eine spezifische Rolle von Tbx20b, welches eine intakte Tbox- und C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne besitzt, in der Angiogenese des Zebrafischs. Diese Isoform wurde auch in der Maus und dem Menschen gefunden [84, 97]. Sollte es dort ebenfalls die Angiogenese und damit möglicherweise auch die Ausbildung von Koronargefäßen regulieren, könnten angeborene Herzfehler mit kombinierten Septum-, Klappen- und Koronargefäßdefekten mit Mutationen in *tbx20* assoziiert sein. Da die Angiogenese jedoch auch von der frühen Neurogenese abhängt und *tbx20* in vielen Bereichen des embryonalen Gehirns und in Motoneuronen exprimiert wird, könnte die durch MO1-*tbx20* induzierten Angiogenesedefekte ein Hinweis auf neuronale Fehlentwicklungen sein, die nicht von den transkriptionalen Regulatorelementen von Tbx20, sondern nur von Tbx20b abhängen.

6.7 Identifikation neuer Signalwege in der Entwicklung des AVC

Weiches herz^{m245} ermöglicht erstmalig, detailliert die AVC-Entwicklung und die Rolle von Tbx20 in der AVC-Entwicklung aufzuzeigen, zumal die Ausbildung des AVC in einem sehr frühen Stadium gestört ist und keine weiteren offensichtlichen Organdefekte vorliegen. Zur Identifikation neuer Signalwege in der Entwicklung des AVC und der Herzklappen wurde daher ein zebrafischspezifischer cDNA-Microarray mit über 14.000 cDNAs durchgeführt. Die Auswertung des Microarray-Experiments ergab, dass in den mutanten *whz*-Embryonen 251 Gene um mehr als das doppelte hochreguliert und 178 Gene um mehr als 50 % herunterreguliert sind.

Unter den weniger stark exprimierten Genen in mutanten *whz*-Embryonen sind verschiedene kardial-spezifische Myosine (-60 %) und Aktine (-50 %). Dies wurde aufgrund der konfokalmikroskopischen Aufnahmen der ventrikulären Myofilamente erwartet, da diese im Vergleich zum WT in mutanten *whz*-Embryonen deutlich weniger dicht ausgebildet sind und die kardiale Masse verringert ist. Dies beruht zum einen auf der durch Notch1b und Tbx2 inhibierten Expression kontraktiler Proteine und zum anderen auf der ventrikulären Hypoplasie, die auf eine verringerte Proliferation und nicht auf verstärkte Apoptose der ventrikulären Kardiomyozyten zurückzuführen ist.

Auffällig war eine stärkere Expression von *tbx20* (+80 %) und reduzierte Expression von *bmp2* (-60 %) in mutanten *whz*-Embryonen. Die Hochregulation von *tbx20*, die auch in der quantitativen *Real time*-PCR beobachtet wurde, weist auf eine kompensatorische Regulation von Tbx20 auf Basis der affektierten Aktivatorfunktion hin. Gleichzeitig lässt die reduzierte Expression von *bmp2*, das Tbx20 induzieren kann [111, 112, 137], einen negativen *Feedback*-Mechanismus auf Basis intakter Tbx20-Funktionen vermuten, der ein Überangebot von Tbx20 erkennt [78, 111, 119].

Da *bmp4*, das im Gegensatz zu WT- in mutanten *whz*-Embryonen nicht in der AV-Region exprimiert wird, und verschiedene Mitglieder der Tbox-Familie den FGF-Signalweg induzieren können, wurde im Microarray die Expression von Mitgliedern der FGF-Familie und deren Rezeptoren genauer untersucht. Dabei fiel in *whz* die deutlich geringe Expression von *fgf5* (-80 %) und die erheblich verstärkte Expression verschiedener FGF-bindender Proteine, u. a. *fgfr4* (+2000 %), *fop* (+900 %) und *fgfr* und *fibp* (+500 %) auf, was auf eine Regulation dieser Gene durch Tbx20 schließen lässt, wie bereits von Griffin et al. [50] vermutet wurde. Der FGFR4 ist ein Rezeptor für das kardial exprimierte *fgf8* [64, 75] und der *fgf8-Knockout* [1, 115] bzw. -*Knockdown* im Zebrafisch kopiert den *whz*-Phänotyp. Da demnach FGF8 an der Entwicklung des AVC beteiligt ist, kann dies von seinem kardialen Rezeptor FGFR4 gleichfalls vermutet werden. Die Hochregulation der FGF-bindenden Proteine und Rezeptoren in *whz* könnte einerseits durch die fehlende Aktivatorfunktion von Tbx20, andererseits durch fehlende Stimulation durch deren kardiale Liganden bedingt sein. Als Kandidat dafür kommt FGF5 in Frage, welcher durch seine reduzierte Expression in *whz* und kardiale Expression (nicht gezeigt) möglicherweise ein direktes Zielgen von Tbx20 ist, während er in *whz* durch den Verlust der transkriptorischen Aktivatorfunktion von Tbx20 nicht induziert wird. Zur Klärung dieser Frage sind jedoch noch eine Reihe weiterer Experimente notwendig, die eine Regulation von *fgf5* durch Tbx20 und die Rolle von FGF5 in der AVC-Entwicklung untersuchen sollen.

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von FGF-Rezeptoren bei der AVC-Entwicklung wurden Zebrafischembryonen nach der kardialen Fusion bzw. vor und während der AVC-Entwicklung mit dem FGF-Rezeptor-Inhibitor SU5402 behandelt [95]. Diese Embryonen bildeten zwar morphologisch unauffällige Herzen mit phänotypisch normalem AVC aus, zeigten jedoch keine sequentielle, sondern peristaltische Kontraktionen von Atrium und Ventrikel. Dieses Experiment beweist die

entscheidende Rolle des FGF-Signalwegs in der Entstehung des AV-Überleitungssystems, das für die sequentielle Kontraktion von Atrium und Ventrikel verantwortlich ist.

Des Weiteren induziert SU5402 negativ inotrope Effekte im Ventrikel. Um zu untersuchen, ob der FGF-Signalweg einen direkten Einfluss auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten hat, wurden daraufhin kontrahierende neonatale Rattenkardiomyozyten mit SU5402 behandelt und der Verlauf der Kontraktilität verfolgt. Da der FGFR-Inhibitor keinen Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten hatte, muss die beobachtete reduzierte ventrikuläre Kontraktilität ein sekundärer Effekt aufgrund der SU5402-induzierten Morphogenesedefekte des AVC sein.

6.8 Ausblick

Die positionelle Klonierung von *whz* führte zu der Identifikation eines in Vertebraten und Nichtvertebraten exprimierten und hoch konservierten Gens, *tbx20*, welches im Zebrafisch die myo- und endokardiale AVC-Entwicklung reguliert.

Die molekularbiologische Charakterisierung von *whz* und *tbx20-Knockout*-Embryonen mit molekularen AVC-Markern hat das völlige Fehlen eines morphologischen und funktionellen AVC gezeigt. Dies ermöglicht erstmalig die Identifikation neuer Gene und Signalwege, die an der AVC-Entwicklung beteiligt sind. Daraus resultierende Ergebnisse könnten Ansätze zur Therapie von AVC-Defekten bieten.

Aus der Charakterisierung und positionellen Klonierung von *whz* können dazu eine Vielzahl von Projekten hervorgehen.

Zum einen könnten durch Sequenzanalysen der von Tbx20 gebundenen Promotorelemente neue direkte Zielgene von Tbx20 identifiziert werden, die anschließend molekularbiologisch charakterisiert werden. Da die bisher von Stennard et al. [137] und Takeuchi et al. [141] identifizierten Sequenzen nur sehr schwach von Tbx20 gebunden werden, müssten dazu vorerst mit Hilfe von EMSA-Analysen mit Zufallsoligonukleotiden die eigentlichen Erkennungssequenzen von Tbx20 gefunden werden.

In einem weiteren Ansatz könnten Zielgene von Tbx20 über physikalische Interaktionspartner identifiziert werden. Die Interaktionspartner, i.d.R. ebenfalls Transkriptionsfaktoren oder transkriptionale Regulatoren, könnten dazu durch

yeast-two-hybrid-Untersuchungen gefunden werden. Durch die Charakterisierung dieser Erkennungssequenzen können dann weitere direkte Zielgene von Tbx20 identifiziert werden.

Darüber hinaus sollte mit RNA aus mutanten *whz*-Herzen ein herzspezifischer Microarray gegen aus Herzgewebe isolierten *expressed sequence tags* durchgeführt werden, da hier Veränderungen in den Expressionsmustern durch den Verlust des AVC stärker ins Gewicht fallen als mit der Verwendung von RNA aus ganzen Embryonen.

Um weitere Zielgene von Tbx20 und dessen weitere Rolle in der Herzentwicklung zu evaluieren, könnte des Weiteren die Repressordomäne von Tbx20 durch Mutagenese oder *Morpholino-Knockdown* inhibiert und der resultierende Phänotyp charakterisiert werden. Daraus gewonnene Daten könnten dann u. a. die Rolle der synergistischen Aktivität von Tbx20 und Tbx5 erklären.

Tbx20 ist bisher mit keinem humanen Krankheitsbild assoziiert. Die intraatrialen Septierungen beim *whz*-Phänotyp erinnern jedoch stark an das sehr seltene humane Krankheitsbild des *Cor triatriatum*, bei welchem das linke Atrium durch eine perforierte fibromuskuläre Membran zweigeteilt ist. Da dieser angeborene Herzdefekt mit weiteren Herzfehlern, wie atrialen und ventrikulären Septumdefekten, einem persistierenden *Ductus arteriosus Botalli* und AVC-Defekten assoziiert ist, die auch aus dem *whz*-Phänotyp ableitbar sind, könnten Defekte in *tbx20* mit dem Krankheitsbild des *Cor triatriatum* assoziiert sein. Daher ist ein wichtiges aus dieser Arbeit resultierendes Projekt die Sequenzierung von *tbx20* bei *Cor triatriatum*-Patienten. Sollten diese Mutationen in *tbx20* tragen, könnten durch standardisierte Nachweismethoden Verwandte und Nachkommen dieser Patienten untersucht werden, um einerseits Spätfolgen des *Cor triatriatum* durch geeignete Interventionen abzumildern. Andererseits könnten Informationen über die Vererbung durch Stammbaumanalysen gewonnen und als Grundlage für die Abschätzung des Krankheitsrisikos zukünftiger Generationen verwendet werden. Mit der Stammbaumanalyse könnte zudem der Erbmodus, ein wichtiger Aspekt für die genetische Beratung, evaluiert werden.

7 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%	Prozent
‰	Promille
μ	Mikro-
A	Adenin
AB	Zebrafischlinie AB
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
<i>amhc</i>	atrial myosin heavy chain
<i>anf</i>	atrialer natriuretischer Faktor
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxysulfat
AV-	atrioventrikulär
AVC	atrioventrikulärer Kanal
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCIP	5'-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat-p-Tluidinsalz
<i>bmp2</i>	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basepaare
BSA	bovines Serumalbumin
c	Centi-
C	Cystein
C	Cytosin
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
cM	centiMorgan
cR	centiRay
DMEM	(Dulbecco's) Modified Eagle Medium
DMF	N-N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
dpf	Tage nach der Befruchtung (<i>days post fertilization</i>)
DTT	Dithiothreitol

FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethylsulfat
EMT	Endothelial-zu-Mesenchymale Transformation
EST	<i>expressed sequence tag</i>
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
Het	heterozygot- <i>whz</i>
HF	Herzfrequenz
hpf	Stunden nach der Befruchtung (<i>hours post fertilization</i>)
IFT	Einflusstrakt (<i>Sinus venosus</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
k	Kilo-
kb	Kilobasen
L	Liter
LB	Luria Bertani Broth
LG	<i>linkage group</i>
LMP	Low melting point
m	Meter
m	Milli-
M	Molar (mol/L)
m ³	Kubikmeter
min	Minute
<i>mlc2</i>	<i>myosin light chain 2</i>
MO	<i>Morpholino antisense</i> -Oligonukleotid
MOK	Kontroll- <i>Morpholino (sense)</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

Mut	homozygot <i>whz</i> -mutant
n	Probenanzahl
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OFT	Ausflusstrakt (<i>Bulbus arteriosus</i>)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p	Piko-
PA	Pascal
PAA	Polyacrylamid
PAC	<i>P1-derived artificial chromosome</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RH	<i>radiation hybrid</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Somiten
S	Serin
S	Siemens
TBE	<i>T-box binding element</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TL	Zebrafischlinie <i>tübingen line</i>
TUNEL	Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
<i>vmhc</i>	<i>ventricular myosin heavy chain</i>
<i>whz</i>	Weiches Herz ^{M245}
WIK	Zebrafischlinie <i>wild indian kalkutta</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i>

8 Literaturverzeichnis

1. Abu-Issa, R., G. Smyth, I. Smoak, K. Yamamura, and E.N. Meyers, *Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse*. Development, 2002. 129(19): p. 4613-25.
2. Ackermann, G.E. and B.H. Paw, *Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders*. Front Biosci, 2003. 8: p. d1227-53.
3. Adell, T. and W.E. Muller, *Expression pattern of the Brachyury and Tbx2 homologues from the sponge Suberites domuncula*. Biol Cell, 2005. 97(8): p. 641-50.
4. Agulnik, S.I., R.J. Bollag, and L.M. Silver, *Conservation of the T-box gene family from Mus musculus to Caenorhabditis elegans*. Genomics, 1995. 25(1): p. 214-9.
5. Ahn, D.G., I. Ruvinsky, A.C. Oates, L.M. Silver, and R.K. Ho, *tbx20, a new vertebrate T-box gene expressed in the cranial motor neurons and developing cardiovascular structures in zebrafish*. Mech Dev, 2000. 95(1-2): p. 253-8.
6. Alexander, J., M. Rothenberg, G.L. Henry, and D.Y. Stainier, *casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish*. Dev Biol, 1999. 215(2): p. 343-57.
7. Allende, M.L., A. Amsterdam, T. Becker, K. Kawakami, N. Gaiano, and N. Hopkins, *Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development*. Genes Dev, 1996. 10(24): p. 3141-55.
8. Amemiya, C.T., T.P. Zhong, G.A. Silverman, M.C. Fishman, and L.I. Zon, *Zebrafish YAC, BAC, and PAC genomic libraries*. Methods Cell Biol, 1999. 60: p. 235-58.
9. Amsterdam, A. and N. Hopkins, *Retrovirus-mediated insertional mutagenesis in zebrafish*. Methods Cell Biol, 1999. 60: p. 87-98.
10. Amsterdam, A., C. Yoon, M. Allende, T. Becker, K. Kawakami, S. Burgess, N. Gaiano, and N. Hopkins, *Retrovirus-mediated insertional mutagenesis in zebrafish and identification of a molecular marker for embryonic germ cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1997. 62: p. 437-50.
11. Ando, H. and M. Mishina, *Mutagenesis in zebrafish*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2000. 45(17 Suppl): p. 2829-37.
12. Armstrong, E.J. and J. Bischoff, *Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation*. Circ Res, 2004. 95(5): p. 459-70.
13. Bartman, T., E.C. Walsh, K.K. Wen, M. McKane, J. Ren, J. Alexander, P.A. Rubenstein, and D.Y. Stainier, *Early myocardial function affects endocardial cushion development in zebrafish*. PLoS Biol, 2004. 2(5): p. E129.

14. Begemann, G., Y. Gibert, A. Meyer, and P.W. Ingham, *Cloning of zebrafish T-box genes tbx15 and tbx18 and their expression during embryonic development*. Mech Dev, 2002. 114(1-2): p. 137-41.
15. Beis, D., T. Bartman, S.W. Jin, I.C. Scott, L.A. D'Amico, E.A. Ober, H. Verkade, J. Frantsve, H.A. Field, A. Wehman, H. Baier, A. Tallafuss, L. Bally-Cuif, J.N. Chen, D.Y. Stainier, and B. Jungblut, *Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development*. Development, 2005. 132(18): p. 4193-204.
16. Benson, D.W., G.M. Silberbach, A. Kavanaugh-McHugh, C. Cottrill, Y. Zhang, S. Riggs, O. Smalls, M.C. Johnson, M.S. Watson, J.G. Seidman, C.E. Seidman, J. Plowden, and J.D. Kugler, *Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways*. J Clin Invest, 1999. 104(11): p. 1567-73.
17. Biben, C., R. Weber, S. Kesteven, E. Stanley, L. McDonald, D.A. Elliott, L. Barnett, F. Koentgen, L. Robb, M. Feneley, and R.P. Harvey, *Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5*. Circ Res, 2000. 87(10): p. 888-95.
18. Bollag, R.J., Z. Siegfried, J.A. Cebra-Thomas, N. Garvey, E.M. Davison, and L.M. Silver, *An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus*. Nat Genet, 1994. 7(3): p. 383-9.
19. Branford, W.W., J.J. Essner, and H.J. Yost, *Regulation of gut and heart left-right asymmetry by context-dependent interactions between xenopus lefty and BMP4 signaling*. Dev Biol, 2000. 223(2): p. 291-306.
20. Breckenridge, R.A., T.J. Mohun, and E. Amaya, *A role for BMP signalling in heart looping morphogenesis in Xenopus*. Dev Biol, 2001. 232(1): p. 191-203.
21. Brent, L.J. and P. Drapeau, *Targeted "knockdown" of channel expression in vivo with an antisense morpholino oligonucleotide*. Neuroscience, 2002. 114(2): p. 275-8.
22. Briggs, J.P., *The zebrafish: a new model organism for integrative physiology*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 282(1): p. R3-9.
23. Brown, D.D., O. Binder, M. Pagratis, B.A. Parr, and F.L. Conlon, *Developmental expression of the Xenopus laevis Tbx20 orthologue*. Dev Genes Evol, 2003. 212(12): p. 604-7.
24. Brown, D.D., S.N. Martz, O. Binder, S.C. Goetz, B.M. Price, J.C. Smith, and F.L. Conlon, *Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis*. Development, 2005. 132(3): p. 553-63.
25. Buescher, M., P.C. Svendsen, M. Tio, C. Miskolczi-McCallum, G. Tear, W.J. Brook, and W. Chia, *Drosophila T box proteins break the symmetry of hedgehog-dependent activation of wingless*. Curr Biol, 2004. 14(19): p. 1694-702.

26. Burgtorf, C., K. Welzel, R. Hasenbank, G. Zehetner, S. Weis, and H. Lehrach, *Gridded genomic libraries of different chordate species: a reference library system for basic and comparative genetic studies of chordate genomes*. Genomics, 1998. 52(2): p. 230-2.
27. Cai, C.L., W. Zhou, L. Yang, L. Bu, Y. Qyang, X. Zhang, X. Li, M.G. Rosenfeld, J. Chen, and S. Evans, *T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis*. Development, 2005. 132(10): p. 2475-87.
28. Carreira, S., B. Liu, and C.R. Goding, *The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes*. J Biol Chem, 2000. 275(29): p. 21920-7.
29. Chen, J.N. and M.C. Fishman, *Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation*. Development, 1996. 122(12): p. 3809-16.
30. Chen, J.N. and M.C. Fishman, *Genetics of heart development*. Trends Genet, 2000. 16(9): p. 383-8.
31. Chen, J.N., P. Haffter, J. Odenthal, E. Vogelsang, M. Brand, F.J. van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, M. Hammerschmidt, C.P. Heisenberg, Y.J. Jiang, D.A. Kane, R.N. Kelsh, M.C. Mullins, and C. Nusslein-Volhard, *Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish*. Development, 1996. 123: p. 293-302.
32. Chen, J.N., F.J. van Eeden, K.S. Warren, A. Chin, C. Nusslein-Volhard, P. Haffter, and M.C. Fishman, *Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish*. Development, 1997. 124(21): p. 4373-82.
33. Cheng, S.H., P.K. Chan, and R.S. Wu, *The use of microangiography in detecting aberrant vasculature in zebrafish embryos exposed to cadmium*. Aquat Toxicol, 2001. 52(1): p. 61-71.
34. Christoffels, V.M., J.B. Burch, and A.F. Moorman, *Architectural plan for the heart: early patterning and delineation of the chambers and the nodes*. Trends Cardiovasc Med, 2004. 14(8): p. 301-7.
35. Christoffels, V.M., P.E. Habets, D. Franco, M. Campione, F. de Jong, W.H. Lamers, Z.Z. Bao, S. Palmer, C. Biben, R.P. Harvey, and A.F. Moorman, *Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart*. Dev Biol, 2000. 223(2): p. 266-78.
36. Christoffels, V.M., W.M. Hoogaars, A. Tessari, D.E. Clout, A.F. Moorman, and M. Campione, *T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers*. Dev Dyn, 2004. 229(4): p. 763-70.
37. Cui, Z., Y. Yang, C.D. Kaufman, D. Agalliu, and P.B. Hackett, *RecA-mediated, targeted mutagenesis in zebrafish*. Mar Biotechnol (NY), 2003. 5(2): p. 174-84.
38. Dickmeis, T., P. Mourrain, L. Saint-Etienne, N. Fischer, P. Aanstad, M. Clark, U. Strahle, and F. Rosa, *A crucial component of the endoderm formation*

- pathway, CASANOVA, is encoded by a novel sox-related gene. Genes Dev*, 2001. 15(12): p. 1487-92.
39. Driever, W., L. Solnica-Krezel, A.F. Schier, S.C. Neuhauss, J. Malicki, D.L. Stemple, D.Y. Stainier, F. Zwartkuis, S. Abdelilah, Z. Rangini, J. Belak, and C. Boggs, *A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. Development*, 1996. 123: p. 37-46.
40. Driever, W., D. Stemple, A. Schier, and L. Solnica-Krezel, *Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. Trends Genet*, 1994. 10(5): p. 152-9.
41. Fischer, A., N. Schumacher, M. Maier, M. Sendtner, and M. Gessler, *The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. Genes Dev*, 2004. 18(8): p. 901-11.
42. Fishman, M.C. and D.Y. Stainier, *Cardiovascular development. Prospects for a genetic approach. Circ Res*, 1994. 74(5): p. 757-63.
43. Gaiano, N., M. Allende, A. Amsterdam, K. Kawakami, and N. Hopkins, *Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(15): p. 7777-82.
44. Gaiano, N., A. Amsterdam, K. Kawakami, M. Allende, T. Becker, and N. Hopkins, *Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. Nature*, 1996. 383(6603): p. 829-32.
45. Garg, V., A.N. Muth, J.F. Ransom, M.K. Schluterman, R. Barnes, I.N. King, P.D. Grossfeld, and D. Srivastava, *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. Nature*, 2005. 437(7056): p. 270-4.
46. Garrity, D.M., S. Childs, and M.C. Fishman, *The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. Development*, 2002. 129(19): p. 4635-45.
47. Gaussin, V., G.E. Morley, L. Cox, A. Zwijsen, K.M. Vance, L. Emile, Y. Tian, J. Liu, C. Hong, D. Myers, S.J. Conway, C. Depre, Y. Mishina, R.R. Behringer, M.C. Hanks, M.D. Schneider, D. Huylebroeck, G.I. Fishman, J.B. Burch, and S.F. Vatner, *Alk3/Bmpr1a receptor is required for development of the atrioventricular canal into valves and annulus fibrosus. Circ Res*, 2005. 97(3): p. 219-26.
48. Geisler, R., G.J. Rauch, H. Baier, F. van Bebber, L. Brobeta, M.P. Dekens, K. Finger, C. Fricke, M.A. Gates, H. Geiger, S. Geiger-Rudolph, D. Gilmour, S. Glaser, L. Gnugge, H. Habeck, K. Hingst, S. Holley, J. Keenan, A. Kirn, H. Knaut, D. Lashkari, F. Maderspacher, U. Martyn, S. Neuhauss, P. Haffter, and et al., *A radiation hybrid map of the zebrafish genome. Nat Genet*, 1999. 23(1): p. 86-9.
49. Griffin, K.J. and D. Kimelman, *One-Eyed Pinhead and Spadetail are essential for heart and somite formation. Nat Cell Biol*, 2002. 4(10): p. 821-5.

50. Griffin, K.J., J. Stoller, M. Gibson, S. Chen, D. Yelon, D.Y. Stainier, and D. Kimelman, *A conserved role for H15-related T-box transcription factors in zebrafish and Drosophila heart formation*. Dev Biol, 2000. 218(2): p. 235-47.
51. Grundt, A., Rottbauer, W., *Mutagenesis Approaches in the Zebrafish*, in *Encyclopedic References of Genomics and Proteomics*, G.D. Ruckpaul K., Editor. 2006, Springer-Verlag: Heidelberg.
52. Habets, P.E., A.F. Moorman, and V.M. Christoffels, *Regulatory modules in the developing heart*. Cardiovasc Res, 2003. 58(2): p. 246-63.
53. Habets, P.E., A.F. Moorman, D.E. Clout, M.A. van Roon, M. Lingbeek, M. van Lohuizen, M. Campione, and V.M. Christoffels, *Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation*. Genes Dev, 2002. 16(10): p. 1234-46.
54. Haffter, P., M. Granato, M. Brand, M.C. Mullins, M. Hammerschmidt, D.A. Kane, J. Odenthal, F.J. van Eeden, Y.J. Jiang, C.P. Heisenberg, R.N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian, and C. Nusslein-Volhard, *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio*. Development, 1996. 123: p. 1-36.
55. Haffter, P. and C. Nusslein-Volhard, *Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish*. Int J Dev Biol, 1996. 40(1): p. 221-7.
56. Harrelson, Z., R.G. Kelly, S.N. Goldin, J.J. Gibson-Brown, R.J. Bollag, L.M. Silver, and V.E. Papaioannou, *Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development*. Development, 2004. 131(20): p. 5041-52.
57. Harvey, R.P., D. Lai, D. Elliott, C. Biben, M. Solloway, O. Prall, F. Stennard, A. Schindeler, N. Groves, L. Lavulo, C. Hyun, T. Yeoh, M. Costa, M. Furtado, and E. Kirk, *Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. 67: p. 107-14.
58. Henderson, D.J. and A.J. Copp, *Versican expression is associated with chamber specification, septation, and valvulogenesis in the developing mouse heart*. Circ Res, 1998. 83(5): p. 523-32.
59. Houweling, A.C., S. Somi, M.J. Van Den Hoff, A.F. Moorman, and V.M. Christoffels, *Developmental pattern of ANF gene expression reveals a strict localization of cardiac chamber formation in chicken*. Anat Rec, 2002. 266(2): p. 93-102.
60. Houweling, A.C., M.M. van Borren, A.F. Moorman, and V.M. Christoffels, *Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease*. Cardiovasc Res, 2005. 67(4): p. 583-93.
61. Hove, J.R., R.W. Koster, A.S. Forouhar, G. Acevedo-Bolton, S.E. Fraser, and M. Gharib, *Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis*. Nature, 2003. 421(6919): p. 172-7.

62. Hu, N., D. Sedmera, H.J. Yost, and E.B. Clark, *Structure and function of the developing zebrafish heart*. Anat Rec, 2000. 260(2): p. 148-57.
63. Hu, N., H.J. Yost, and E.B. Clark, *Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish*. Anat Rec, 2001. 264(1): p. 1-12.
64. Hughes, S.E., *Differential Expression of the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Multigene Family in Normal Human Adult Tissues*. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1997. 45(7): p. 1005-1019.
65. Hukriede, N., D. Fisher, J. Epstein, L. Joly, P. Tellis, Y. Zhou, B. Barbazuk, K. Cox, L. Fenton-Noriega, C. Hersey, J. Miles, X. Sheng, A. Song, R. Waterman, S.L. Johnson, I.B. Dawid, M. Chevette, L.I. Zon, J. McPherson, and M. Ekker, *The LN54 radiation hybrid map of zebrafish expressed sequences*. Genome Res, 2001. 11(12): p. 2127-32.
66. Hukriede, N.A., L. Joly, M. Tsang, J. Miles, P. Tellis, J.A. Epstein, W.B. Barbazuk, F.N. Li, B. Paw, J.H. Postlethwait, T.J. Hudson, L.I. Zon, J.D. McPherson, M. Chevette, I.B. Dawid, S.L. Johnson, and M. Ekker, *Radiation hybrid mapping of the zebrafish genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(17): p. 9745-50.
67. Hwang, S.P., M.F. Tsou, Y.C. Lin, and C.H. Liu, *The zebrafish BMP4 gene: sequence analysis and expression pattern during embryonic development*. DNA Cell Biol, 1997. 16(8): p. 1003-11.
68. Iio, A., M. Koide, K. Hidaka, and T. Morisaki, *Expression pattern of novel chick T-box gene, Tbx20*. Dev Genes Evol, 2001. 211(11): p. 559-62.
69. Ivics, Z., P.B. Hackett, R.H. Plasterk, and Z. Izsvak, *Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells*. Cell, 1997. 91(4): p. 501-10.
70. Jamali, M., C. Karamboulas, P.J. Rogerson, and I.S. Skerjanc, *BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis*. FEBS Lett, 2001. 509(1): p. 126-30.
71. Jamali, M., C. Karamboulas, S. Wilton, and I.S. Skerjanc, *Factors in serum regulate Nkx2.5 and MEF2C function*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001. 37(10): p. 635-7.
72. Jay, P.Y., C.I. Berul, M. Tanaka, M. Ishii, Y. Kurachi, and S. Izumo, *Cardiac conduction and arrhythmia: insights from Nkx2.5 mutations in mouse and humans*. Novartis Found Symp, 2003. 250: p. 227-38; discussion 238-41, 276-9.
73. Jerome-Majewska, L.A., G.P. Jenkins, E. Ernstoff, F. Zindy, C.J. Sherr, and V.E. Papaioannou, *Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19(Arf)/p53-independent pathway*. Dev Dyn, 2005.

74. Jiao, K., H. Kulesa, K. Tompkins, Y. Zhou, L. Batts, H.S. Baldwin, and B.L. Hogan, *An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart*. Genes Dev, 2003. 17(19): p. 2362-7.
75. Kästner, S., Elias, C., Rivera, A.J., Yablonka-Reuveni, Z., *Gene Expression Patterns of the Fibroblast Growth Factors and Their Receptors During Myogenesis of Rat Satellite Cells*. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2000. 48(8): p. 1079-1096.
76. Kikuchi, Y., A. Agathon, J. Alexander, C. Thisse, S. Waldron, D. Yelon, B. Thisse, and D.Y. Stainier, *casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish*. Genes Dev, 2001. 15(12): p. 1493-505.
77. Kikuchi, Y., L.A. Trinh, J.F. Reiter, J. Alexander, D. Yelon, and D.Y. Stainier, *The zebrafish bonnie and clyde gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors*. Genes Dev, 2000. 14(10): p. 1279-89.
78. Kishimoto, Y., K.H. Lee, L. Zon, M. Hammerschmidt, and S. Schulte-Merker, *The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning*. Development, 1997. 124(22): p. 4457-66.
79. Klein, A.D., Riegman, P.H.J., Bijlsma, E.K., Heldoorn, A., Muijtjens M., Bakker, M.A., Avezaat, C.J.J. and Zwarthoff, E.C., *A G→A transition creates a branch point sequence and activation of a cryptic exon, resulting in the hereditary disorder neurofibromatosis 2*. Human Molecular Genetics, 1998. 7(3): p. 393-398.
80. Knapik, E.W., *ENU mutagenesis in zebrafish--from genes to complex diseases*. Mamm Genome, 2000. 11(7): p. 511-9.
81. Knapik, E.W., A. Goodman, O.S. Atkinson, C.T. Roberts, M. Shiozawa, C.U. Sim, S. Weksler-Zangen, M.R. Trollet, C. Futrell, B.A. Innes, G. Koike, M.G. McLaughlin, L. Pierre, J.S. Simon, E. Vilallonga, M. Roy, P.W. Chiang, M.C. Fishman, W. Driever, and H.J. Jacob, *A reference cross DNA panel for zebrafish (Danio rerio) anchored with simple sequence length polymorphisms*. Development, 1996. 123: p. 451-60.
82. Knapik, E.W., A. Goodman, M. Ekker, M. Chevrette, J. Delgado, S. Neuhauss, N. Shimoda, W. Driever, M.C. Fishman, and H.J. Jacob, *A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (Danio rerio)*. Nat Genet, 1998. 18(4): p. 338-43.
83. Kochilas, L.K., V. Potluri, A. Gitler, K. Balasubramanian, and A.J. Chin, *Cloning and characterization of zebrafish tbx1*. Gene Expr Patterns, 2003. 3(5): p. 645-51.
84. Kraus, F., B. Haenig, and A. Kispert, *Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene tbx20*. Mech Dev, 2001. 100(1): p. 87-91.

85. Kupperman, E., S. An, N. Osborne, S. Waldron, and D.Y. Stainier, *A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development*. Nature, 2000. 406(6792): p. 192-5.
86. Lee, R.K., D.Y. Stainier, B.M. Weinstein, and M.C. Fishman, *Cardiovascular development in the zebrafish. II. Endocardial progenitors are sequestered within the heart field*. Development, 1994. 120(12): p. 3361-6.
87. Lee, Y.M., J.J. Cope, G.E. Ackermann, K. Goishi, E.J. Armstrong, B.H. Paw, and J. Bischoff, *Vascular endothelial growth factor receptor signaling is required for cardiac valve formation in zebrafish*. Dev Dyn, 2005.
88. Lekven, A.C., K.A. Helde, C.J. Thorpe, R. Rooke, and R.T. Moon, *Reverse genetics in zebrafish*. Physiol Genomics, 2000. 2(2): p. 37-48.
89. Lin, S., N. Gaiano, P. Culp, J.C. Burns, T. Friedmann, J.K. Yee, and N. Hopkins, *Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish*. Science, 1994. 265(5172): p. 666-9.
90. Lingbeek, M.E., J.J. Jacobs, and M. van Lohuizen, *The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator*. J Biol Chem, 2002. 277(29): p. 26120-7.
91. Liu, W., J. Selever, D. Wang, M.F. Lu, K.A. Moses, R.J. Schwartz, and J.F. Martin, *Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(13): p. 4489-94.
92. Logan, M., H.G. Simon, and C. Tabin, *Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity*. Development, 1998. 125(15): p. 2825-35.
93. Lohr, J.L. and H.J. Yost, *Vertebrate model systems in the study of early heart development: Xenopus and zebrafish*. Am J Med Genet, 2000. 97(4): p. 248-57.
94. Lyons, G.E., *Vertebrate heart development*. Curr Opin Genet Dev, 1996. 6(4): p. 454-60.
95. Martinez-Torrecuadrada, J., G. Cifuentes, P. Lopez-Serra, P. Saenz, A. Martinez, and J.I. Casal, *Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation*. Clin Cancer Res, 2005. 11(17): p. 6280-90.
96. McCallum, W.D., *Fetal cardiac anatomy and vascular dynamics*. Clin Obstet Gynecol, 1981. 24(3): p. 837-49.
97. Meins, M., D.J. Henderson, S.S. Bhattacharya, and J.C. Sowden, *Characterization of the human TBX20 gene, a new member of the T-Box gene family closely related to the Drosophila H15 gene*. Genomics, 2000. 67(3): p. 317-32.
98. Minguillon, C. and M. Logan, *The comparative genomics of T-box genes*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2003. 2(3): p. 224-33.

99. Miskolczi-McCallum, C.M., R.J. Scavetta, P.C. Svendsen, K.H. Soanes, and W.J. Brook, *The Drosophila melanogaster T-box genes midline and H15 are conserved regulators of heart development*. Dev Biol, 2005. 278(2): p. 459-72.
100. Moorman, A.F., F. de Jong, M.M. Denyn, and W.H. Lamers, *Development of the cardiac conduction system*. Circ Res, 1998. 82(6): p. 629-44.
101. Moorman, A.F., A.T. Soufan, J. Hagoort, P.A. de Boer, and V.M. Christoffels, *Development of the building plan of the heart*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1015: p. 171-81.
102. Mori, T., Y.F. Chen, J.A. Feng, T. Hayashi, S. Oparil, and G.J. Perry, *Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse*. Cardiovasc Res, 2004. 61(4): p. 771-9.
103. Moskowitz, I.P., A. Pizard, V.V. Patel, B.G. Bruneau, J.B. Kim, S. Kupersmidt, D. Roden, C.I. Berul, C.E. Seidman, and J.G. Seidman, *The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system*. Development, 2004. 131(16): p. 4107-16.
104. Muller, C.W. and B.G. Herrmann, *Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor*. Nature, 1997. 389(6653): p. 884-8.
105. Mullins, M.C., M. Hammerschmidt, P. Haffter, and C. Nusslein-Volhard, *Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate*. Curr Biol, 1994. 4(3): p. 189-202.
106. Nakajima, Y., T. Yamagishi, S. Hokari, and H. Nakamura, *Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP)*. Anat Rec, 2000. 258(2): p. 119-27.
107. Niederreither, K., J. Vermot, N. Messaddeq, B. Schuhbaur, P. Chambon, and P. Dolle, *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse*. Development, 2001. 128(7): p. 1019-31.
108. Norton, P.A., *Alternative pre-mRNA splicing: factors involved in splice site selection*. Journal of Cell Science, 1994. 107: p. 1-7.
109. Patton, E.E. and L.I. Zon, *The art and design of genetic screens: zebrafish*. Nat Rev Genet, 2001. 2(12): p. 956-66.
110. Paxton, C., H. Zhao, Y. Chin, K. Langner, and J. Reecy, *Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription*. Gene, 2002. 283(1-2): p. 117-24.
111. Plageman, T.F., Jr. and K.E. Yutzey, *Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development*. J Biol Chem, 2004.
112. Plageman, T.F., Jr. and K.E. Yutzey, *T-box genes and heart development: putting the "T" in heart*. Dev Dyn, 2005. 232(1): p. 11-20.

113. Qian, L., J. Liu, and R. Bodmer, *Neuromancer Tbx20-related genes (H15/midline) promote cell fate specification and morphogenesis of the Drosophila heart*. Dev Biol, 2005. 279(2): p. 509-24.
114. Rawls, J.F., M.R. Frieda, A.R. McAdow, J.P. Gross, C.M. Clayton, C.K. Heyen, and S.L. Johnson, *Coupled mutagenesis screens and genetic mapping in zebrafish*. Genetics, 2003. 163(3): p. 997-1009.
115. Reifers, F., E.C. Walsh, S. Leger, D.Y. Stainier, and M. Brand, *Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar)*. Development, 2000. 127(2): p. 225-35.
116. Reim, I., J.P. Mohler, and M. Frasch, *Tbx20-related genes, mid and H15, are required for tinman expression, proper patterning, and normal differentiation of cardioblasts in Drosophila*. Mech Dev, 2005. 122(9): p. 1056-69.
117. Reiter, J.F., J. Alexander, A. Rodaway, D. Yelon, R. Patient, N. Holder, and D.Y. Stainier, *Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish*. Genes Dev, 1999. 13(22): p. 2983-95.
118. Reiter, J.F., Y. Kikuchi, and D.Y. Stainier, *Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation*. Development, 2001. 128(1): p. 125-35.
119. Reiter, J.F., H. Verkade, and D.Y. Stainier, *Bmp2b and Oep promote early myocardial differentiation through their regulation of gata5*. Dev Biol, 2001. 234(2): p. 330-8.
120. Rickenbacher, P., *Herzinsuffizienz: Epidemiologie, Pathophysiologie*. Swiss Medical Forum, 2001. 1/10: p. 4-9.
121. Rowley, M., E. Grothey, and F.J. Couch, *The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. 9(2): p. 109-18.
122. Ryan, K. and A.J. Chin, *T-box genes and cardiac development*. Birth Defects Res Part C Embryo Today, 2003. 69(1): p. 25-37.
123. Schilling, T.F., J.P. Concordet, and P.W. Ingham, *Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4*. Dev Biol, 1999. 210(2): p. 277-87.
124. Schimenti, J. and M. Bucan, *Functional genomics in the mouse: phenotype-based mutagenesis screens*. Genome Res, 1998. 8(7): p. 698-710.
125. Schott, J.J., D.W. Benson, C.T. Basson, W. Pease, G.M. Silberbach, J.P. Moak, B.J. Maron, C.E. Seidman, and J.G. Seidman, *Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5*. Science, 1998. 281(5373): p. 108-11.
126. Serbedzija, G.N., J.N. Chen, and M.C. Fishman, *Regulation in the heart field of zebrafish*. Development, 1998. 125(6): p. 1095-101.

127. Shawber, C.J. and J. Kitajewski, *Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man*. Bioessays, 2004. 26(3): p. 225-34.
128. Sheng, W., G. Wang, Y. Wang, J. Liang, J. Wen, P.S. Zheng, Y. Wu, V. Lee, J. Slingerland, D. Dumont, and B.B. Yang, *The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis*. Mol Biol Cell, 2005. 16(3): p. 1330-40.
129. Singh, M.K., V.M. Christoffels, J.M. Dias, M.O. Trowe, M. Petry, K. Schuster-Gossler, A. Burger, J. Ericson, and A. Kispert, *Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2*. Development, 2005. 132(12): p. 2697-707.
130. Skerjanc, I.S., H. Petropoulos, A.G. Ridgeway, and S. Wilton, *Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells*. J Biol Chem, 1998. 273(52): p. 34904-10.
131. Snow, H.E., L.M. Riccio, C.H. Mjaatvedt, S. Hoffman, and A.A. Capehart, *Versican expression during skeletal/joint morphogenesis and patterning of muscle and nerve in the embryonic mouse limb*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005. 282(2): p. 95-105.
132. Stainier, D.Y., *Zebrafish genetics and vertebrate heart formation*. Nat Rev Genet, 2001. 2(1): p. 39-48.
133. Stainier, D.Y., D. Beis, B. Jungblut, and T. Bartman, *Endocardial cushion formation in zebrafish*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. 67: p. 49-56.
134. Stainier, D.Y. and M.C. Fishman, *Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity*. Dev Biol, 1992. 153(1): p. 91-101.
135. Stainier, D.Y., R.K. Lee, and M.C. Fishman, *Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation*. Development, 1993. 119(1): p. 31-40.
136. Stanford, W.L., J.B. Cohn, and S.P. Cordes, *Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond*. Nat Rev Genet, 2001. 2(10): p. 756-68.
137. Stennard, F.A., M.W. Costa, D.A. Elliott, S. Rankin, S.J. Haast, D. Lai, L.P. McDonald, K. Niederreither, P. Dolle, B.G. Bruneau, A.M. Zorn, and R.P. Harvey, *Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart*. Dev Biol, 2003. 262(2): p. 206-24.
138. Stennard, F.A., M.W. Costa, D. Lai, C. Biben, M.B. Furtado, M.J. Solloway, D.J. McCulley, C. Leimena, J.I. Preis, S.L. Dunwoodie, D.E. Elliott, O.W. Prall, B.L. Black, D. Fatkin, and R.P. Harvey, *Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation*. Development, 2005. 132(10): p. 2451-62.

139. Stottmann, R.W., M. Choi, Y. Mishina, E.N. Meyers, and J. Klingensmith, *BMP receptor 1A is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium*. Development, 2004. 131(9): p. 2205-18.
140. Szeto, D.P., K.J. Griffin, and D. Kimelman, *HrT is required for cardiovascular development in zebrafish*. Development, 2002. 129(21): p. 5093-101.
141. Takeuchi, J.K., M. Mileikowskaia, K. Koshiba-Takeuchi, A.B. Heidt, A.D. Mori, E.P. Arruda, M. Gertsenstein, R. Georges, L. Davidson, R. Mo, C.C. Hui, R.M. Henkelman, M. Nemer, B.L. Black, A. Nagy, and B.G. Bruneau, *Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development*. Development, 2005. 132(10): p. 2463-74.
142. Takeuchi, J.K., M. Ohgi, K. Koshiba-Takeuchi, H. Shiratori, I. Sakaki, K. Ogura, Y. Saijoh, and T. Ogura, *Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis*. Development, 2003. 130(24): p. 5953-64.
143. Tanaka, M., Z. Chen, S. Bartunkova, N. Yamasaki, and S. Izumo, *The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development*. Development, 1999. 126(6): p. 1269-80.
144. Tanaka, M., S.B. Wechsler, I.W. Lee, N. Yamasaki, J.A. Lawitts, and S. Izumo, *Complex modular cis-acting elements regulate expression of the cardiac specifying homeobox gene Csx/Nkx2.5*. Development, 1999. 126(7): p. 1439-50.
145. Timmerman, L.A., J. Grego-Bessa, A. Raya, E. Bertran, J.M. Perez-Pomares, J. Diez, S. Aranda, S. Palomo, F. McCormick, J.C. Izpisua-Belmonte, and J.L. de la Pompa, *Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation*. Genes Dev, 2004. 18(1): p. 99-115.
146. Trinh le, A. and D.Y. Stainier, *Cardiac development*. Methods Cell Biol, 2004. 76: p. 455-73.
147. Weber, H., C.E. Symes, M.E. Walmsley, A.R. Rodaway, and R.K. Patient, *A role for GATA5 in Xenopus endoderm specification*. Development, 2000. 127(20): p. 4345-60.
148. Weinstein, B.M. and M.C. Fishman, *Cardiovascular morphogenesis in zebrafish*. Cardiovasc Res, 1996. 31 Spec No: p. E17-24.
149. Wienholds, E., F. van Eeden, M. Kusters, J. Mudde, R.H. Plasterk, and E. Cuppen, *Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish*. Genome Res, 2003. 13(12): p. 2700-7.
150. Wilson, V. and F.L. Conlon, *The T-box family*. Genome Biol, 2002. 3(6): p. REVIEWS3008.

151. Yamagishi, T., Y. Nakajima, S. Nishimatsu, T. Nohno, K. Ando, and H. Nakamura, *Expression of tbx20 RNA during chick heart development*. Dev Dyn, 2004. 230(3): p. 576-80.
152. Yelon, D., *Cardiac patterning and morphogenesis in zebrafish*. Dev Dyn, 2001. 222(4): p. 552-63.
153. Yelon, D., J.L. Feldman, and B.R. Keegan, *Genetic regulation of cardiac patterning in zebrafish*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. 67: p. 19-25.
154. Yelon, D., S.A. Horne, and D.Y. Stainier, *Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish*. Dev Biol, 1999. 214(1): p. 23-37.
155. Yelon, D. and D.Y. Stainier, *Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation*. Semin Cell Dev Biol, 1999. 10(1): p. 93-8.
156. Yelon, D. and D.Y. Stainier, *Pattern formation: swimming in retinoic acid*. Curr Biol, 2002. 12(20): p. R707-9.
157. Yelon, D., B.M. Weinstein, and M.C. Fishman, *Cardiovascular system*. Results Probl Cell Differ, 2002. 40: p. 298-321.
158. Yutzey, K.E., J.T. Rhee, and D. Bader, *Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart*. Development, 1994. 120(4): p. 871-83.
159. Zaffran, S. and M. Frasch, *Early signals in cardiac development*. Circ Res, 2002. 91(6): p. 457-69.
160. Zhong, T.P., K. Kaphingst, U. Akella, M. Haldi, E.S. Lander, and M.C. Fishman, *Zebrafish Genomic Library in Yeast Artificial Chromosomes*. Genomics, 1998. 48(1): p. 136-8.

9 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer, Herrn Dr. Wolfgang Rottbauer, danken, der mir das spannende Thema mit viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht und mich in schwierigen Situationen mit seiner Diskussionsbereitschaft und seinen wertvollen Ratschlägen motiviert hat.

Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland gilt mein Dank für die Übernahme des Erstgutachtens und für seine unkomplizierte Unterstützung meines Promotionsverfahrens.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Werner Buselmaier für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Prof. Dr. Uwe Strähle und PD Dr. Dieter Weichenhan für ihre Bereitschaft, meiner Prüfungskommission beizusitzen.

Ein besonderes Dankeswort gilt Dr. Daniel Schaft und Prof. Dr. Richard Harvey (The Victor Chang Cardiac Research Institute, Darlinghurst, NSW, Australien) für ihre kooperative Hilfe bei der Analyse den funktionellen Tbx20-Analysen, die einen wichtigen Bestandteil dieser Arbeit darstellen.

Großen Dank schulde ich auch meinen Kollegen des Labors Rottbauer der Inneren Medizin III in Heidelberg (Garnet Bendig, David Hassel, Steffen Just, Sabine Marquart, Melanie Peters, Jörg-Gerd Rauch, Nicole Trano und Georgia Wessels), die durch ihre Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für die schöne Zeit im Labor.

Des Weiteren danke ich Prof. Michael Brand (MPI Dresden) für die Bereitstellung des *fgf8-Morpholinos* und Juan-Ramon Martinez-Morales für den FGFR-Inhibitor SU5402.

Den größten Dank schulde ich meiner Frau Christina, die mich auch in schwierigsten Zeiten unterstützt und ertragen hat und ohne deren Hilfe ich am erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit stark gezweifelt hätte.

Ihr möchte ich diese Arbeit widmen.